

**UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS**

**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA**

**E.A.P. DE MEDICINA VETERINARIA**

**Prevalencia de seroreactores positivos a *Brucella canis*  
por inmunodifusión en Agar Gel en el distrito de Los  
Olivos**

**TESIS**

**Para optar el Título Profesional de Médico Veterinario**

**AUTOR**

**Maza Villanera María Rosario**

**Lima – Perú**

**2013**



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS  
Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA

**Facultad de Medicina Veterinaria**  
ESCUELA ACADÉMICO-PROFESIONAL DE MEDICINA VETERINARIA

Trabajo sustentado y aprobado ante el Jurado designado por la Escuela Académico Profesional de Medicina Veterinaria mediante Resolución Directoral N°. 162-EAPMV/FMV-2013

PRESIDENTE :

ARMANDO GONZÁLEZ ZARIQUIEY

MIEMBROS :

SIEVER MORALES CAUTI  
Asesor de la Tesis

SONIA CALLE ESPINOZA

JACQUELINE CAHUA UGARTE

San Borja, 16 de diciembre de 2013

Vº Bº

.....  
MV. DIEGO DÍAZ COAHILA  
Director de la Escuela Académico Profesional de  
Medicina Veterinaria





## ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE MÉDICO VETERINARIO

En el auditorio principal de la Facultad de Medicina Veterinaria, el día lunes **16 de Diciembre del 2013**, a las **13:00** horas, se constituyó el Jurado Examinador designado mediante Resolución Directoral N° **162-EAPMV/FMV-2013**, integrado por los siguientes profesores:

<b>ARMANDO GONZÁLEZ ZARIQUIEY</b>	Presidente del Jurado
<b>SIEVER MORALES CAUTI</b>	Asesor de la Tesis
<b>SONIA CALLE ESPINOZA</b>	Miembro del Jurado
<b>JACQUELINE CAHUA UGARTE</b>	Miembro del Jurado

Luego de la instalación del Jurado, a cargo del Presidente del Jurado y bajo la dirección del mismo, la Bachiller Doña: **MAZA VILLANERA, MARÍA ROSARIO**, para optar el Título Profesional de Médico Veterinario, procedió a sustentar públicamente la Tesis:

### "PREVALENCIA DE SEROREACTORES POSITIVOS A *Brucella canis* POR INMUNODIFUSIÓN EN AGAR GEL EN EL DISTRITO DE LOS OLIVOS"

Luego de absolver las preguntas del Jurado y del público asistente, el Jurado deliberó con la abstención reglamentaria del Asesor de la Tesis y acordó su **APROBACIÓN** por **UNANIMIDAD**, otorgándole la nota de **DIECISÉIS ( 16 )**.

Habiéndose aprobado la sustentación pública de la Tesis, el Presidente en representación del Jurado recomienda que la Escuela Académico Profesional de Medicina Veterinaria proponga la aprobación del **TÍTULO PROFESIONAL DE MÉDICO VETERINARIO** a la Facultad de Medicina Veterinaria y que ésta proponga al Rectorado el otorgamiento respectivo.

Siendo las **14:15 Horas** concluyó el acto académico de sustentación pública de Tesis en fe de lo cual suscriben la presente acta por cuadruplicado los integrantes del Jurado:

Armando González Zariquiey: PhD. Prof. Principal, T.C.

Siever Morales Cauti: MV. Prof. Asociado, T.P.

Sonia Calle Espinoza: Mg. Prof. Principal, D.E.

Jacqueline Cahua Ugarte: Esp. Prof. Auxiliar, T.P.



## DEDICATORIA

Dedico el presente trabajo, en primer lugar a Dios por haberme dado la vida, e iluminarme todos los días por el camino del bien

A mis padres Manuel Maza y Margarita Villanera, ya que gracias a sus consejos me guiaron a ser lo que soy, y por enseñarme con paciencia y ejemplos lo difícil y sencillo de la vida.

A mis hermanas Isabel, Angélica, Pilar y Carolina, por todo su apoyo tanto en las buenas como en las malas, por sus consejos su tiempo y enseñarme que juntas podemos hacer todo posible. A mis sobrinos Joaquín y Sebastián, por todo el cariño y momentos compartidos por enseñarme a nunca dejar de ser niño.

A mis amigos, gracias por todo el cariño, confianza y momentos compartidos me encantaría nombrar a cada uno de ustedes ya que significan mucho en mi vida: Las famosas chinchas mis mejores amigas de la universidad (Mónica, Aimé, Carmen, Rosa y Luz). Tampoco podría dejar de nombrarlos a ustedes: Naty, Cynthia, Rony, Aldo muchas gracias por su amistad sincera.

## AGRADECIMIENTOS

A mi alma mater la Universidad Nacional Mayor de San Marcos y a mi querida facultad de Medicina Veterinaria por haber hecho de mi toda una profesional.

A mi director M.v Siever Morales Cauti, por apoyarme en todo momento y confiar en mí para la realización de este proyecto y por ser más que un profesor, un verdadero amigo.

A todos los integrantes del taller de animales de compañía (TAC) que me ayudaron incondicionalmente en todos los muestreos, en especial a Miguel Cucho fuiste mi ayudante estrella y pieza muy importante en este proyecto.

A la veterinaria PETS VIDA, muchas gracias por darme la oportunidad, el apoyo y la confianza, son parte muy importante en este proyecto y en mi vida. En especial a la Esther y Margoth Cueva Arevalo mis jefas y muy grandes amigas.

A todas las personas que me ayudaron a la realización del presente trabajo de tesis, en especial a la Municipalidad de Los Olivos por apoyar este proyecto y darme la confianza de realizarlo, en especial a la Mv. Nancy Huamán y a todos los dueños de los caninos que participaron en el muestreo.

# ÍNDICE

ÍNDICE.....	vi
RESUMEN.....	ix
ABSTRACT.....	x
LISTA DE CUADROS .....	xi
LISTA DE GRÁFICOS .....	xii
LISTA DE ANEXOS .....	xiii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xv
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1 DEFINICIÓN.....	3
2.2 HISTORIA.....	3
2.3 ETIOLOGIA.....	5
2.4 MORFOLOGIA.....	7
2.5 MEDIOS DE CULTIVOS.....	7
2.6 CARACTERISTICAS DE CRECIMIENTO.....	8
2.7 PROPIEDADES BIOQUÍMICAS Y METABÓLICAS.....	9
2.8 CARACTERISTICAS ANTIGÉNICAS.....	15
2.9 GENÉTICA.....	19
2.10 SENSIBILIDAD A DESINFECTANTES.....	22
2.11 EPIDEMIOLOGÍA.....	22
2.11.1 Distribución geográfica.....	22
2.11.2 Especies susceptibles.....	24
2.11.3 Transmisión.....	26
2.12 PATOGENIA.....	28
2.13 INMUNIDAD.....	30
2.14 SIGNOS CLÍNICOS.....	31
2.15 HALLAZGOS HISTOPATOLÓGICOS.....	33
2.15.1 En hembras.....	34

2.15.2	En machos.....	34
2.15.3	En fetos.....	37
2.16	DIAGNOSTICO.....	37
2.16.1	DIAGNOSTICO CLINICO.....	37
2.16.2	DATOS DE LABORATORIO.....	37
2.16.3	EXAMEN DE SEMEN – ESPERMATOGRAFIAS.....	38
2.16.4	MICROSCOPIA.....	38
2.16.5	SEROLOGIA.....	39
	A) PRUEBAS DE RUTINA.....	40
	1. Aglutinación rápida en placa.....	40
	2. Aglutinación rápida en placa 2-mercaptoetanol.....	40
	3. Seroaglutinación en tubo.....	41
	4. Seroaglutinación en tubo 2-mercaptoetanol.....	41
	B) PRUEBAS CONFIRMATORIAS.....	41
	1. Inmunodifusión en agar gel.....	41
	2. Prueba de anticuerpo fluorescente indirecto.....	43
	3. Ensayo Inmunoenzimatico ligado a enzimas.....	43
	4. Reacción en cadena de polimerasa.....	44
	5. Fijación de complemento.....	44
2.16.6	CULTIVO BACTERIANO.....	44
2.17	TRATAMIENTO.....	46
2.18	PRONOSTICO.....	47
2.19	PREVENCION Y CONTROL.....	47
2.20	IMPLICANCIA EN SALUD PUBLICA.....	49
III.	MATERIALES Y METODOS.....	51
3.1	METODOLOGIA DEL ESTUDIO.....	51
3.2	LUGAR Y PERIODO DE ESTUDIO.....	51
3.3	DESCRIPCION DEL MATERIAL EXPERIMENTAL.....	52
	a) Tamaño muestral.....	52
	b) Toma de muestra.....	53
	c) Procesamiento de las muestras – prueba diagnóstica.....	54
	d) Obtención de la información.....	56
	e) Análisis estadístico.....	56
IV.	RESULTADOS.....	59

4.1 RESULTADOS DE SEROPREVALENCIA.....	58
4.2 REGRESION LOGISTICA MULTINOMIAL.....	60
4.3 RESULTADOS EN LA POBLACION DE CANINOS HEMBRAS.....	61
V. DISCUSIÓN.....	63
VI. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	67
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	69
VIII. ANEXOS.....	79



## RESUMEN

La brucelosis canina es una enfermedad infecciosa ocasionada por la bacteria *Brucella canis* (*B. canis*) que se caracteriza por la presentación de diversos trastornos reproductivos. Además, debido a su carácter zoonótico, es considerada una enfermedad ocupacional en seres humanos. El presente estudio evaluó la prevalencia de seroreactores a *B. canis* en el distrito de Los Olivos a través del método de diagnóstico serológico: Inmunodifusión en Agar Gel (IDAG). Con este fin se recolectaron 288 muestras de sangre de caninos provenientes de los sectores norte, sur, este y oeste del distrito. A partir de estas muestras se obtuvieron 1 mililitro de suero sanguíneo. Se realizó la prueba de IGDA con antígeno de *B. canis* para determinar seropositividad a brucelosis canina. Los resultados indicaron una prevalencia corregida de 5.43% (IC  $\pm$  2.31%) de seroreactores a *B. canis*. Los resultados del análisis univariado no demostraron asociación estadística significativa entre las variables incluidas en el estudio (edad, sexo, condición fisiológica, hábitos de paseo e historia reproductiva) sobre los resultados de serología a *B. canis* ( $p > 0.05$ ). El análisis multivariado mediante el modelo de regresión logística multinomial (RLM) y el posterior análisis mediante el test de razón de Verosimilitud (LRTest) indicó que la edad de los perros (animales mayores de 1 año vs animales menores de 1 año) así como la historia reproductiva (animales sin historia de cruces vs animales con historia de cruces) son las variables que mejor explican los resultados de seropositividad a *B. canis* en el estudio. (LRTest Modelo regresión con edad e historia reproductiva  $p < 0.05$ ). Los resultados indican que existe exposición a *B. canis* en la población canina del distrito de Los Olivos, lo cual representa la gran importancia epidemiológica, dado el carácter zoonótico de la enfermedad.

**PALABRAS CLAVES:** *B. canis*, IDAG, Brucelosis canina, prevalencia

## ABSTRACT

Canine Brucellosis is an infectious disease caused by the *Brucella canis* bacterium (*B. canis*) characterized by the presentation of various reproductive disorders. Moreover, due to its zoonotic nature, is considered an occupational disease in human beings. This study evaluated the prevalence of seroreactors to *B. canis* in the district of Los Olivos through serological diagnostic method: Agar Gel Immunodiffusion (AGID). For this purpose, 288 blood samples were collected from dogs from areas north, south, east and west of the district. From these samples we obtained 1 milliliter of blood serum. The AGID with antigen *B. canis* was performed in order to determine canine brucellosis seropositivity. The results showed a corrected prevalence of 5.43% ( $IC \pm 2.31\%$ ) of seroreactors to *B. canis*. The results of the univariate analysis did not show significant statistical association between the variables included in the study (age, sex, physiological condition, walking habits, reproductive history) on the results of serology to *B. canis* ( $p > .05$ ). Multivariate analysis using multinomial logistic regression (MLR) and subsequent analysis using the Likelihood ratio test (LRTest) indicated that the age of the dogs (animals older than 1 year vs animals less than 1 year) and the reproductive history (animals without a history of animal crossings history vs. crosses) are the variables that best explain the results of seropositivity to *B. canis* in the study (LRTest regression model with age and reproductive history  $p < .05$ ). The results indicate exposure to *B. canis* in the dog population of Los Olivos district, representing the epidemiological importance, given the zoonotic nature of the disease.

**KEYWORDS:** *B. canis*, AGID, Canine Brucellosis, prevalence

## LISTA DE CUADROS

<b>CUADRO 1.</b> Especies del género <i>Brucella sp</i>	<b>Pág.6</b>
<b>CUADRO 2.</b> Características bioquímicas de <i>Brucella sp.</i>	<b>Pág.10</b>
<b>CUADRO3.</b> Características de crecimiento del género <i>Brucella sp.</i>	<b>Pág.10</b>
<b>CUADRO 4.</b> Características antigénicas del género <i>Brucella sp.</i>	<b>Pág.12</b>
<b>CUADRO 5.</b> Características de <i>Brucella canis</i> .	<b>Pág.13</b>
<b>CUADRO 6.</b> Características del metabolismo oxidativo de <i>Brucella canis</i> .	<b>Pág.14</b>
<b>CUADRO 7.</b> Clasificación antigua de las especies del género <i>Brucella sp.</i>	<b>Pág.21</b>
<b>CUADRO 8.</b> Casos de brucelosis humana en América Latina 1977 – 2002.	<b>Pág.27</b>
<b>CUADRO 9.</b> Supervivencia de <i>Brucella</i> en el medio ambiente.	<b>Pág.28</b>
<b>CUADRO 10.</b> Efecto de la brucelosis canina sobre los índices reproductivos.	<b>Pág.31</b>
<b>CUADRO 11.</b> Resultados de prevalencia corregida a seroreactores contra <i>Brucella canis</i> en el distrito de Los Olivos mediante prueba de Inmunodifusión en Agar Gel, y distribución de resultados de acuerdo a las variables incluidas en el estudio.	<b>Pág.60</b>
<b>CUADRO 12.</b> Resultados del modelo de regresión logística multinomial para la evaluación del efecto de todas las variables sobre los resultados de serología a <i>Brucella canis</i> . (Modelo 1)	<b>Pág.61</b>
<b>CUADRO 13.</b> Resultados de prevalencia corregida a seroreactores contra <i>Brucella canis</i> en el distrito de Los Olivos mediante prueba de Inmunodifusión en Agar Gel en la población de caninos hembras mayores de 1 año.	<b>Pág.62</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA 1</b> Estructura de la membrana externa de la pared celular de <i>Brucella sp.</i>	<b>Pág.16</b>
<b>FIGURA 2.</b> Estructura del lipopolisacárido de <i>Brucella sp.</i>	<b>Pág.17</b>
<b>FIGURA 3.</b> Microscopia de Túbulos seminíferos.	<b>Pág.36</b>
<b>FIGURA 4.</b> Microscopia de Túbulos seminíferos.	<b>Pág.36</b>
<b>FIGURA 5.</b> Campaña de salud y empadronamiento en parques de Los Olivos	<b>Pág.53</b>
<b>FIGURA 6.</b> Toma de muestras a caninos del Distrito de Los Olivos.	<b>Pág.53</b>
<b>FIGURA 7.</b> Procesamiento de la prueba diagnóstica.	<b>Pág.55</b>
<b>FIGURA 8.</b> Resultados positivos.	<b>Pág.56</b>

## LISTA DE ANEXOS

- ANEXO 1.** Espacio geográfico – Distrito de Los Olivos,
- ANEXO 2.** Ubicación geográfica de las zonas del muestreo en el Distrito de Los Olivos
- ANEXOS 3.** Encuesta realizada a propietarios de las mascotas muestreadas.
- ANEXO 4.** Asociación Diagnostico *Brucella canis* y sexo.
- ANEXO 5.** Asociación *Brucella canis* y edad.
- ANEXO 6.** Asociación *Brucella canis* y condición fisiológica.
- ANEXO 7.** Asociación *Brucella canis* y hábito de paseo en mascota.
- ANEXO 8.** Asociación *Brucella canis* e historia de cruces.
- ANEXO 9.** Resultados del modelo de regresión logística para evaluar el efecto de las variables predictoras sobre la variable respuesta (Modelo 1),
- ANEXO 10.** Resultados del análisis de razón de verosimilitud (Likelihood ratio test) para la evaluación del modelo global en relación al intercepto (Modelo 1).
- ANEXO 11.** Modelo de regresión logística ajustado a las variables edad e historia de cruces, sobre el diagnóstico de *Brucella canis* (Modelo 2).
- ANEXO 12.** Resultados del análisis de razón de verosimilitud (Likelihood ratio test) para la evaluación del modelo reducido en relación al intercepto (Modelo 2).

**ANEXO 13.** Asociación *Brucella canis* e historia de aborto (Solo en población de hembras muestreadas).

**ANEXO 14.** Asociación *Brucella canis* e historia de parto con crías muertas (Solo en población de hembras muestreadas).

**ANEXO 15.** Cuadro de Variables utilizadas.

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>ADN</b>	: Ácido desoxirribonucleico
<b>B. abortus</b>	: <i>Brucella abortus</i>
<b>B. canis</b>	: <i>Brucella canis</i>
<b>B. melitensis</b>	: <i>Brucella melitensis</i>
<b>B. neotomae</b>	: <i>Brucella neotomae</i>
<b>B. ovis</b>	: <i>Brucella ovis</i>
<b>B. suis</b>	: <i>Brucella suis</i>
<b>C</b>	: Citosina
<b>CO<sub>2</sub></b>	: Dióxido de Carbono
<b>G</b>	: Guanina
<b>H<sub>2</sub>S</b>	: Sulfuro de Hidrogeno
<b>IC</b>	: Intervalo de confianza
<b>IDAG</b>	: Inmunodifusión en agar gel
<b>Ig G</b>	: Inmunoglobulina G
<b>Ig M</b>	: Inmunoglobulina M
<b>kDa</b>	: kilos Dalton
<b>KDO</b>	: Ácido 3-deoxy-D-nanno octulosónico
<b>L P S</b>	: Lipopolisacárido
<b>LPS-R</b>	: Lipopolisacárido cepa lisa
<b>LPS-S</b>	: Lipopolisacárido cepa rugosa
<b>LRTest</b>	: Test de razón de verosimilitud
<b>ME</b>	: Membrana externa
<b>mg.</b>	: Miligramos
<b>ml.</b>	: Mililitros
<b>p.</b>	: Prevalencia
<b>PC</b>	: Prevalencia corregida
<b>PCR</b>	: Reacción cadena de Polimerasa
<b>PME</b>	: Proteínas de membrana externa
<b>R</b>	: Rugosos
<b>RLM</b>	: Regresión logística multinomial
<b>rRNA</b>	: Ácido ribonucleico ribosomal
<b>S</b>	: Lisas

## I. INTRODUCCION

En los últimos 25 años se ha producido en varios países, un notorio incremento en el número de criaderos de perros, en los cuales existen sistemas adecuados para el registro de producción. Esto ha propiciado la identificación de enfermedades que hasta entonces habían pasado desapercibidas; tal es el caso de la infección causada por *B. canis*.

La brucelosis canina es una enfermedad infecciosa, de curso crónico y de carácter zoonótico, ocasionada por *B. canis*, bacteria pequeña y gramnegativa que fue reconocida por primera vez en 1966, como causa de abortos y fracasos reproductivos en criaderos de perros en Estados Unidos (Carmichael y Kenney, 1968). Desde entonces la enfermedad ha sido reconocida en varios países, principalmente en Centro y Sur América; también en los estados de la zona Sur de Estados Unidos y reportadas esporádicamente en criaderos de perros en Europa y algunos países asiáticos (Cotrino *et al.*, 2003).

Los únicos hospederos naturales de la enfermedad son los cánidos, cuya transmisión se da principalmente a través de la ingestión de tejidos placentarios contaminados, fetos abortados, descargas vaginales de perras infectadas que presentan celo, así como semen de animales infectados (Shin y Carmichael, 1999). Sin embargo, el hombre puede infectarse de forma accidental por lo que es considerada una enfermedad zoonótica (Stoenner y Kaplan,



1979). La sintomatología clínica observada en perros infectados por *B. canis* va desde animales asintomáticos, linfadenopatía, orquitis, epididimitis, pérdidas embrionarias, abortos y atrofia testicular (Hollett, 2006).

La terapia médica es considerada impráctica, debido a su efectividad parcial así como a los altos costos incluidos en el tratamiento de curso prolongado. Por ello, las medidas de prevención y control de la enfermedad resulta una herramienta fundamental. El monitoreo serológico de poblaciones caninas es de vital importancia, así como la detección y eliminación de animales infectados; la castración y la implementación de programas de cuarentena para animales que ingresan a un criadero (Hollett, 2006).

Debido al carácter zoonótico de la brucelosis es de vital importancia poder alertar, tanto a profesionales del área veterinaria como a criadores y autoridades sanitarias competentes, sobre su posible presencia en nuestro medio y consideren en su quehacer diario medidas preventivas y correctivas que contribuyan a su control. El objetivo del presente estudio fue determinar la prevalencia de perros seroreactores a *B. canis* mediante la prueba de IDAG en el distrito de Los Olivos, además de evaluar el efecto de la edad, sexo, condición fisiológica, hábitos de paseo e historial reproductivo sobre los resultados de serología a *B. canis*.

## **II. REVISION BIBLIOGRAFICA**

### **2.1. DEFINICIÓN**

La brucelosis canina es una enfermedad infecciosa de carácter zoonótico y de distribución mundial, excepto en países considerados libres como Nueva Zelanda y Australia (OIE, 2007); es considerada una enfermedad infectocontagiosa específica, de curso subagudo o crónico, caracterizada por una bacteriemia de larga duración con presentación clínica o subclínica, que afecta principalmente los sistemas músculo esquelético y reproductivo (Cottrino *et al.*, 2003), siendo la causa más común de aborto infeccioso canino en criaderos y en menor grado en mascotas (Peter, 2000; Cottrino *et al.*, 2003). Los signos más comunes reportados en los animales afectados son: Aborto, placentitis, epididimitis y orquitis (OIE, 2007).

### **2.2. HISTORIA**

La historia de esta enfermedad se remota a fines del siglo XIX en la isla Malta, donde las tropas inglesas allí apostadas, sufrían el embate de una afección que ocasionaba la muerte de un gran número de soldados (Castro *et al.*, 2005). Ante esta situación el Gobierno inglés envió una comisión investigadora llamada “Mediterranean Fever Commission” presidida por el médico anátomo-patólogo militar David Bruce quien en 1887, había descubierto unos microbios pequeños en bazo hipertrofiados de soldados fallecidos en Malta (Sbriglio *et al.*, 2007). Al cabo

de un año consiguió el aislamiento y el cultivo de la bacteria que llamó *Micrococcus Melitensis* (Navarro *et al.*, 2002).

El profesor L.F. Benhard Bang, patólogo veterinario y bacteriólogo Danés, describió un organismo causante de abortos en ganado bovino en 1895 llamado *Bacillus abortus* (Crespo, 1994). En 1918 la microbióloga norteamericana Alice Evans, comparo los microbios aislados por Bruce y Bang; confirmando experimentalmente las estrechas relaciones taxonómicas entre ambos microorganismos (Orduña, 2001). En 1920 Meyer y Show crearon el género *Brucella* en honor a su descubridor, que incluía dos especies: *B. melitensis* y *B. abortus* (Lucero, 2000).

A partir de ese momento, diferentes investigadores hallan bacterias en diferentes animales que forman parte del genero *Brucella*. Actualmente este género incluye siete especies: *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*, *B. ovis*, *B. canis*, *B. neotomae* y *B. maris* (Samartino *et al.*, 1994).

En 1966 en EEUU Carmichael y Bruner, aislaron de fetos caninos de raza Beagle, una nueva especie conocida como *Brucella canis* (Crespo, 1994; Carmichael y Shin, 1996; Lucero *et al.*, 2010).

En el Continente Americano no se puede establecer con exactitud la aparición de la enfermedad. Algunos autores consideran que los orígenes de la brucelosis se remontan a la época de la conquista y que pudo ingresar a América con los animales domésticos importados de España y de otros países europeos (Acha y Szyfres, 2003).

En América Latina, la brucelosis canina es considerada una enfermedad endémica en varios países. En Colombia, un estudio realizado en 2001-2002 determinó 20.3% de seropositividad a *B. canis* en perros de la ciudad de Bogotá (Cotrino *et al.*, 2003). Asimismo, un estudio serológico realizado en Argentina demostró positividad a *B. canis* en 7.3% de la población canina muestreada (Boeri *et al.*, 2008). En Brasil se reportó por primera vez en Minas Gerais (Godoy *et al.*, 1976), desde entonces ha sido diagnostica en todo el Brasil, con

una prevalencia que oscila desde 0.84 hasta 58.3% y se concentra principalmente en el sudeste y sur de Brasil (Xavier *et al.*, 2010).

En el Perú, el primer estudio de brucelosis canina fue realizado por Reyes (1977), dicho estudio demostró un 28% de seropositividad a *B. canis* en perros de Lima Metropolitana; sin embargo uno de los últimos estudios desarrollados en la provincia constitucional del Callao, la seroprevalencia de brucelosis canina ha sido estimada en un 15.57% (Ramírez, 2006).

### 2.3. ETIOLOGIA

*Brucella* sp. son cocobacilos pequeños, gramnegativos, sin cápsula, patógenos intracelulares facultativos (Shin y Carmichael, 1999). El género *Brucella* incluye seis especies denominadas sobre la base de la especificidad de la especie huésped (Forbes y Tessaro, 1996; Samartino y Enright, 1996). Se conoce seis especies diferenciadas por el huésped natural preferido, que incluyen, *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. ovis*, *B. canis*, *B. suis* y *B. neotomae* (Acha y Szyfres, 2003).

Desde mediados de los 90, se han registrado casos de *Brucella* en mamíferos marinos, las cuales son diferentes a los tipos de *Brucella* que afectan a los mamíferos terrestres; dando origen a una nueva especie de *Brucella* sp., denominada: *Brucella maris* (López *et al.*, 2007) . Originalmente dentro de esta nueva especie se incluyó a todas las cepas que afectan a los mamíferos marinos, con la división de 2 biovariedades, basados en la especificidad del hospedador; el biovar 1 afecta a focas y nutrias, mientras que el biovar 2 contendría aislados en cetáceos (FAO, 2009). Una propuesta más reciente sugiere una división en, al menos, dos especies: *B. pinnipediae* para las cepas de pinnípedos (focas, leones marinos y morsas) y *B. cetaceae* para los aislados de los cetáceos (ballenas, delfines y marsopas) (Foster *et al.*, 2007) (Cuadro1).

**Cuadro 1. Especies del género *Brucella* sp.**

ESPECIE	BIOVAR	HUESPED NATURAL PREFERIDO
<i>Brucella melitensis</i>	1 - 3	Cabra, Oveja
<i>Brucella abortus</i>	1 - 9	Bovino
	1	Cerdo
	2	Cerdo, Liebre
<i>Brucella suis</i>	3	Cerdo
	4	Renos
	5	Cerdo
<i>Brucella ovis</i>	-	Oveja
<i>Brucella neotomae</i>	-	Rata
<i>Brucella canis</i>	-	Perros
<i>Brucella pinnipediae</i>	-	Focas, Morsa
<i>Brucella cetaceae</i>	-	Ballenas, Delfines

(Fuente: Castro *et al.*, 2005; López *et al.*, 2007.)

*B. canis*, se distingue de otros miembros del género de *Brucella* por sus colonias rugosas, sus disimilitudes en sus reacciones bioquímicas y antigénicas, y por su número limitado de hospedadores (Carmichael y Craig, 1993).

A diferencia de las demás especies de brucelas, *B. canis* tiene un espectro de hospedadores limitado, pues en la naturaleza se ha demostrado únicamente que son vulnerables los perros y cánidos silvestres (Ettinger, 2002). Sin embargo, se ha reportado casos en humanos que tiene una estrecha relación con la población canina como los médicos veterinarios, personas del laboratorio y criadores (Crespo, 1994); por lo mencionado anteriormente, la infección causada por *B. canis* en el hombre es considerada una enfermedad ocupacional (Azevedo *et al.*, 2003). La infección causada por *B. canis* en humanos, se

caracterizada por: fiebre, dolor de cabeza, linfadenitis, faringitis, dolores musculares, sudoración y esplenomegalia (Swenson *et al.*, 1972).

## **2.4. MORFOLOGIA**

La brucelosis canina es una enfermedad ocasionada por *B. canis*; es un cocobacilo de 0,5 a 0,7 µm de diámetro por 0,5 a 1,5 µm de longitud, inmóvil, no esporulado, aerobio estricto (Vadillo *et al.*, 2002).

Son bacilos cortos, delgados y de bordes redondeados. Pueden verse como cocos ovals o si están por dividirse se ven como diplococos. Generalmente están dispuestos individualmente, aunque a veces lo hacen en parejas o en pequeños grupos de cuatro a seis miembros (Joklik *et al.*, 1997; Vadillo *et al.*, 2002). Debido a su frecuente apariencia cocoide, se puede dudar de su naturaleza bacilar. La apariencia de las colonias de *Brucella* depende de si la cepa es rugosa o lisa (Wilson, 1983).

Las colonias de las cepas antigénicamente lisas son pequeñas, circulares, translúcidas, azuladas y con una superficie brillante; se encuentran individualmente distribuidas uniformemente en filas cortas. Las colonias de cepas antigénicamente rugosas son casi del mismo tamaño, pero son menos convexas, más opacas y tienen una apariencia mate blanco amarillenta (Krieg, 1984).

## **2. 5. MEDIOS DE CULTIVOS**

Se han encontrado satisfactoriamente para el cultivo de *B. canis* los siguientes medios.

### **a) Generales.**

- Agar y caldo tripticasa soya (Laboratorios Difco, USA)
- Agar y caldo triptosa (Laboratorios Difco, USA)

### **b) Selectivos con inhibidores de contaminantes.**

- Agar Thayer Martin (Gibco, USA)
- Kuzdas y Morse (Jones y Brinley, 1958)
- Agar o caldo *Brucella* Albimi (Jones y Brinley, 1958)

Debido a la frecuencia que el material para el cultivo está contaminado se le agrega al medio de cultivo antibióticos como Bacitracina 25,000 U, Polimixina B 4,500 U, Eyeloexamida 100 mg (Carmichael y Kenney, 1968).

## 2.6. CARACTERISTICAS DE CRECIMIENTO

El crecimiento óptimo de *B. canis*, se da en medios como: Agar Brucella (Albimi), Agar Triptosa (Difco), Agar Soya Tripticasa (BBL) y Agar base con 5% de sangre de ovino (Flores y Carmichael, 1981). También crecen bien en medios selectivos sólo con antibióticos, pero no en medios selectivos con cristal violeta y antibióticos (Díaz *et al.*, 1984).

Los medios selectivos de Kuzdas- Moorse y Thayer- Martin han sido empleados con éxito para aislar la bacteria en muestras contaminadas (Flores y Carmichael, 1981). No crece en medios selectivos como el Agar McConkey, ya que la membrana externa de la bacteria no la protege contra los agentes hidrófobos contenidos en dichos medios, tales como sales biliares, detergentes o ciertos colorantes (Buchanan *et al.*, 1974). El crecimiento en medios líquidos se caracteriza por presentar un aspecto de cordón, como sucede en el Caldo Albimi, hay moderada turbidez en 48 horas de incubación formando sedimento varios días después, que al agitarse forma un cordón característico (Flores y Carmichael, 1981).

Durante el crecimiento los microorganismos por lo general están dispuestos individualmente, aunque en ocasiones pueden aparecer en grupos pequeños de cuatro a seis microorganismos (Joklik *et al.*, 1997; Vadillo *et al.*, 2002). El crecimiento bacteriano se hace presente entre las 36 a 48 horas de incubación a 37°C, apareciendo colonias pequeñas de 1 a 5 µm, blanco-grisáceo translúcidas cambiando a un aspecto mucoide al día 5 - 7, la cual se adhiere a la superficie del Agar (Carmichael y Kenney, 1968; Flores y Carmichael, 1981). Si éstas no son visibles dentro de este tiempo y no muestran tener crecimiento, se guardan por 3 o 4 días antes de ser descartadas como negativas (Carmichael y George, 1975; Carmichael, 1978).

En relación a las condiciones de crecimiento, la bacteria se desarrolla en un ambiente aerobio, ya que el CO<sub>2</sub> es inhibitorio (Taul *et al.*, 1967); el crecimiento de *B. canis* se puede inhibir con un 10 % de CO<sub>2</sub>. Los cultivos frescos de *B. canis* son siempre rugosos (R) debido a

la carencia de la cadena “O” del lipopolisacárido (LPS) (CDC, 2011). Las colonias poseen apariencia finamente granular, esto se puede observar utilizando una luz transmitida oblicuamente; también se puede tñir con Ziehl-Neelsen modificada y Koster observándose una tonalidad rojo anaranjada sobre un fondo azul (Briseño *et al.*, 2004).

En base al aspecto de las colonias obtenidas en medio sólido, las diferentes especies de *Brucella* se clasifican habitualmente como lisas (S) o rugosas (R). Dentro de las primeras se encuentran *B. abortus*, *B. Melitensis*, *B. suis*, *B. neotomae*, *B. pinnipedialis* y *B. ceti*; y dentro de las segundas *B. ovis* y *B. canis*. El aspecto que adquieren las colonias se debe a la expresión del LPS en la superficie bacteriana, LPS-S en las lisas y LPS-R en las rugosas, aunque durante su crecimiento en los medios de cultivo pueden experimentar mutaciones que afectan la expresión del LPS (Ariza, 1995).

Las cepas de *Brucella* en fase lisa son más virulentas y su estructura es semejante a la de algunas enterobacterias (*Yersinia enterocolítica*, *Salmonella iandau*, *Pseudomona maltophilia*, *Escherichia coli*), aunque presenta ciertas diferencias en las características de su membrana externa (Corrente *et al.*, 2010).

## **2. 7. PROPIEDADES BIOQUÍMICAS Y METABOLICAS**

Las diferencias bioquímicas entre las diversas especies y sus biotipos son mínimas siendo las más importantes su capacidad para utilizar el CO<sub>2</sub> para producir H<sub>2</sub>S, producen catalasa, ureasa, fermentan lentamente los azúcares y crecen en medios de Tionina y fucsina básica (Jubb *et al.*, 1991) (**Cuadro2**)



**Cuadro 2. Características bioquímicas de *Brucella* sp.**

ESPECIE	REQUERIMIENTO	PRODUCCION	PRODUCCION
	CO <sub>2</sub>	H <sub>2</sub> S	UREASA
<i>Brucella melitensis</i>	-	-	Variable
<i>Brucella abortus</i>	+a	+b	++
<i>Brucella suis</i>	-	++b	+++
<i>Brucella neotomae</i>	-	+	+++
<i>Brucella ovis</i>	+	-	-
<i>Brucella canis</i>	-	-	++++
<i>Brucella pinnipediae</i>	-	-	+
<i>Brucella cetaceae</i>	-	-	+

Donde: a: Algunos biotipos no requieren CO<sub>2</sub>; b: Algunos biotipos no producen H<sub>2</sub>S  
(Fuente: Flores y Carmichael, 1981; Foster *et al.*, 2007)

La capacidad de las brucelas de crecer o ser inhibidas por cantidades variables de fucsina y/o Tionina es característica importante para la identificación preliminar de las diferentes especies del género y sus respectivos biotipos (Morgan, 1970) (**Cuadro 3**)

**Cuadro 3. Características de crecimiento del género *Brucella***

ESPECIE	CRECIMIENTO EN MEDIOS				
	TIONINA			FUCSINA BASICA	
	a	b	c	b	c
<i>Brucella melitensis</i>	-	+	+	+	+
<i>Brucella abortus</i>	-	-d	-d	+	+
<i>Brucella suis</i>	+	+	+	-d	-d
<i>Brucella neotomae</i>	-	-	+	-	-
<i>Brucella ovis</i>	+	+	+	+	+
<i>Brucella canis</i>	+	+	+	-	+/-

Donde: a: Colorante en concentración 1: 25 000, b: Colorante en concentración 1: 50 000,  
c: Colorante en concentración 1: 100 000 y d: Algunos biotipos positivos.

(Fuente: Flores y Carmichael, 1981)

Propiedades adicionales consideradas de tipo convencional para este fin incluyen la necesidad de crecer en presencia de CO<sub>2</sub>, producción de H<sub>2</sub>S, hidrólisis de urea, susceptibilidad a sufrir lisis por el fago y capacidad de aglutinar sueros monovalentes A, M o anti-R (Jones y Brinley, 1958; Carmichael, 1998) (**Cuadro 4**). Otros procedimientos importantes en la clasificación de especies y biotipos es la determinación de su metabolismo oxidativo (Buchanan *et al.*, 1974). Actualmente existen varios biotipos reconocidos entre las especies de *B. abortus*, *B. melitensis* y *B. suis*, pero no se han descrito biotipos de *B. ovis* y *B. canis* (Carmichael, 1978) (**Cuadro 5**).

**Cuadro 4. Características antigénicas del género *Brucella* sp.**

ESPECIE	BIOVARIEDAD	AGLUTINACION CON SUERO MONOESPECÍFICOS		
		A	M	R
<i>Brucella melitensis</i>	1	-	+	-
	2	+	-	-
	3	+	+	-
<i>Brucella abortus</i>	1	+	-	-
	2	+	-	-
	3	+	-	-
	4	-	+	-
	5	-	+	-
	6	+	-	-
	7	+	+	-
	8	+	+	-
	9	-	+	-
<i>Brucella suis</i>	1	+	-	-
	2	+	-	-
	3	+	-	-
	4	+	+	-
	5	-	+	-
<i>Brucella canis</i>	-	-	-	+
<i>Brucella neotomae</i>	-	+	-	-
<i>Brucella ovis</i>	-	-	-	+

Donde: A y M = configuraciones alternativas del PSO, R: LPS de las cepas rugosas.

(Castro *et al.*, 2005)

### Cuadro 5. Características de *Brucella canis*

PRUEBA	RESULTADO
Apariencia colonia	Rugosa
Motilidad	-
Fermentación de carbohidratos	-
Utilización de citrato	-
Producción de urea	++++
Producción de catalasa	++++
Producción de oxidasa	+
Producción de H <sub>2</sub> S	+
Reducción de nitratos	+
Indol	-
Crecimiento en McConkey	-
Crecimiento en Fucsina básica 1:50,000	-
Crecimiento en Fucsina básica 1:50,000	+++
Tionina 1:25000	++
Tionina 1:50,000	++++
Requerimiento de CO <sub>2</sub>	-
Aglutinación con acriflavina	+
Cristal violeta	+
Hemólisis	-
Lactosa	-
Dextrosa	-
Rojo de metilo - Voges Proskawer	-
Licuefacción de gelatina	-

(Fuente: Carmichael, 1998; Briseño *et al.*, 2004; Corrente *et al.*, 2010)

En investigaciones recientes realizadas en la Universidad de Cornell se encontró que de 30 cepas de *B. canis* estudiadas, cinco fueron capaces de crecer en medios que contenían fuertes concentraciones de fucsina básica, mientras que la cepa internacional de referencia (cepa RM6-66) y los otros 24 cultivos fueron totalmente inhibidos por este colorante (Carmichael, 1998).

Además en estudios de metabolismo oxidativo se observó que algunas de estas cepas utilizaron el i-erythritol, el cual no es utilizado por la cepa de referencia (Meyer, 1960) (**Cuadro 6**). En un artículo previamente publicado se describe el aislamiento de una cepa (D519) que también fue resistente a la fucsina básica y utiliza i-erythritol. Esto sugiere la posibilidad de que existan por lo menos dos diferentes biotipos de *B. canis*; sin embargo, faltan aún más pruebas para poder llegar a esa conclusión (Verger *et al.*, 1985).

**Cuadro 6. Características del metabolismo oxidativo de *Brucella canis***

SUBSTRATO	RESULTADO
D-alanina	+
L-alanina	-
L-asparginasa	-
Ac. L-glutámico	+
D,L-ornitonina	+
D,L-citrulina	+
L-arginina	+
L-lisina	+
L-arabinosa	+
L-galactosa	+
D-ribosa	+/-
D-glucosa	+
Eritritol	-

(Fuente: Carmichael, 1998; Briseño *et al.*, 2004; Corrente *et al.*, 2010)

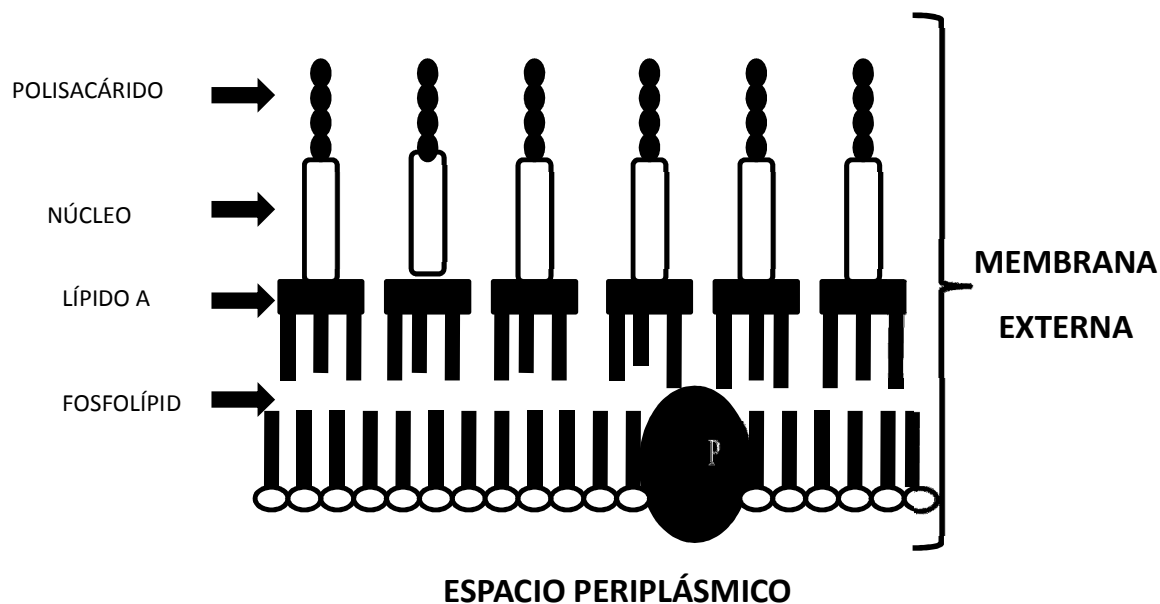
*B. canis* posee propiedades bioquímicas similares a las de *B. suis*, biotipos 3 y 4, razón por la cual diferentes autores han sugerido que este germen sea considerado como un biotipo más de *B. suis* en lugar de ser incluido como una especie diferente (Jones y Brinley, 1958; Carmichael y Greene, 2000). Estudios sobre patogenicidad han demostrado que los porcinos son sumamente resistentes a *B. canis* y que en perros la infección ocurre fácilmente produciendo una enfermedad bien definida; los perros son al parecer el único huésped natural (Buchanan *et al.*, 1974; Carmichael y George, 1975; Zoha y Carmichael, 1982). Otra notable diferencia es la característica mucoide de *B. canis* (Carter, 1985).

La inclusión de esta bacteria dentro del género *Brucella* se vio favorecida por los estudios de ADN, los que mostraron homologías en sus bases guanina y citosina (G-C) similares a los otros miembros del género (Hofer *et al.*, 2012)

## **2.8. CARACTERISTICAS ANTIGENICAS**

La estructura más característica de las bacterias gramnegativas es su envoltura celular, formada por una membrana citoplasmática, una capa de peptidoglicano, un espacio periplasmático intermedio rico en proteínas solubles y una membrana externa (Moriyón *et al.*, 2002). Esta última constituye, sin duda, la estructura de mayor interés desde el punto de vista taxonómico, epizootiológico, antigénico, inmunológico, de diagnóstico y patogénico, todo ello en razón de su particular composición química y estructura antigénica. Dicha membrana, al estar desprovista de cápsula, se encuentra en contacto directo con el medio, y contiene en su superficie los componentes antigénicos más importantes: antígenos de superficie (Crespo, 1994) (**Figura1**)

**Figura 1. Estructura de la membrana externa de la pared celular de *Brucella sp.***



El LPS-S de las formas lisas está constituido por el lípido A, el núcleo y el polisacárido O (PSO). El LPS-R de las formas rugosas carece de cadena O, está reducida a muy pocos residuos.

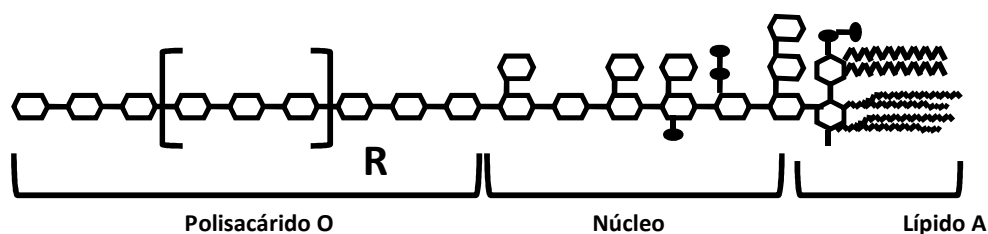
P: proteínas. (Fuente: Castro *et al.*, 2005)

La membrana citoplasmática consta de una bicapa lipídica compuesta por fosfolípidos con ácidos grasos formando unidades hidrofóbicas y glicerol como unidades hidrofílicas. La pared rígida de peptidoglicano, formada por dos derivados de azúcares: N-acetil-glucosamina y N-acetil-murámico, responsables de la forma e integridad osmótica de la bacteria (Ramírez, 2006).

El espacio periplasmático contiene enzimas, algunas de las cuales detoxifican agentes nocivos procedentes del medio, proteínas relacionadas con el transporte de nutrientes y enzimas sobre las que actúan los antibióticos  $\beta$ -lactámicos (Crespo, 1994). La membrana externa (ME), separada de la pared de peptidoglicano por el espacio periplasmático, es la barrera entre la bacteria y el medio ambiente y la primera en entrar en contacto con el sistema inmune del reservorio (Lucero *et al.*, 2005), contiene distribuidos asimétricamente, fosfolípidos, proteínas y un LPS. La simetría en la distribución del LPS y las proteínas que actúan como poros en la membrana externa (porinas), hace que actúe como una barrera de permeabilidad frente a muchos solutos hidrofílicos e hidrofóbicos (Moriyón *et al.*, 2002).

Los LPS constituyen los antígenos estructurales más importantes del genero *Brucella* (Kirk, 1997; Vadillo *et al.*, 2002), constan de una parte glucolipídica (lípid A), inserta en la membrana externa y por tanto no expuesta en la superficie, y otra polisacárida dirigida hacia el exterior. Esta última se divide en dos secciones: el núcleo y la cadena O (**Figura 2**). Las especies *B. ovis* y *B. canis* (especies rugosas) carecen de cadena O y otras que característicamente la poseen, *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis* y *B. neotomae*, (especies lisas), pueden perderla por mutación (mutantes rugosas o R) (Moriyón *et al.*, 2002).

**Figura 2. Estructura del lipopolisacárido (LPS) de *Brucella* sp.**



El polisacárido O está formado por un homopolímero lineal de 10 a 100 perosaminas. El núcleo está compuesto de glucosamina, glucosa, manosa, quinovosamina y contiene poca cantidad de ácido 3-deoxy-D-nanno octulosónico (KDO) y fosfato. El lípido A (endotoxina) de *Brucella* tiene un esqueleto disacárido de dianinoglucosa y ácidos grasos de larga cadena.

(Fuente: Castro *et al.*, 2005)

El lípido A de *Brucella* está formado por un disacárido de diaminoglucosa sustituido con  $\beta$ -hidroxiácidos y otros ácidos grasos de cadena larga, como antígeno; el lípido A no parece tener relevancia diagnóstica (Díaz *et al.*, 1968).

No se conoce en detalle la estructura del núcleo del LPS, si bien se sabe que contiene 2-ceto, 3-deoxy-D-nanno octulosónico (KDO), glucosa, galactosa y quinovosamina, por la cual se une la cadena O. Las cepas rugosas carecen de quinovosamina y por lo tanto de dicha cadena (Díaz *et al.*, 1968); el núcleo no posee heptosas ni fosfatos (Moriyón *et al.*, 2002).

Las PME se asocian estrechamente con los LPS. Dentro de éstas se encuentran las proteínas mayores y menores (Moriyón *et al.*, 2002). Las mayores se clasifican en tres grupos de acuerdo a sus pesos moleculares: grupo 1, de 88 a 94 kDa; su función está relacionada con la biosíntesis de la propia envoltura; grupo 2, de 36 a 38 kDa, son equivalentes a las porinas de



otros gramnegativos; grupo 3, de 25 a 27 y de 31 a 34 kDa, las cuales están fuertemente asociadas al peptidoglicano (Cloeckaert *et al.*, 2002; Salhi *et al.*, 2003) y se encuentran expuestas en la ME, pero son menos accesibles en las cepas lisas que en las rugosas, debido al impedimento estérico ocasionado por las cadenas O del LPS de las primeras (Lucero *et al.*, 2002).

*B. canis* posee en común con las otras especies de *Brucella* numerosos antígenos somáticos, los cuales pueden demostrarse fácilmente mediante estudios de inmunodifusión en gel con antígenos solubles extraídos mediante la ruptura de las células con ultrasonido o con otros métodos; sin embargo, la naturaleza mucoide (rugosa) confiere a la pared celular de esta bacteria propiedades antigénicas diferentes al de las cepas lisas de otras brucelas, por lo cual las técnicas altamente estandarizadas que se utilizan para el diagnóstico de brucelosis en otras especies no pueden usarse en el diagnóstico de infecciones causadas por *B. canis* (Díaz *et al.*, 1968). Se ha demostrado reacciones cruzadas de aglutinación y precipitación entre *B. canis* y otras brucelas en fase rugosa como *B. ovis* y *B. abortus* cepa 45/20; de igual manera se producen reacciones cruzadas entre *B. canis* y algunas otras bacterias gran negativas en fase rugosa, como *Acinetobacter brochisepticus* (antes *Bordetella bronchiseptica*); *Actinobacillus equuli* (Jones y Brinley, 1958; Carmichael *et al.*, 1989; Megid *et al.*, 1999) y con *Pseudomona aeruginosa* (Flores y Carmichael, 1981). El hecho que los antígenos rugosos (R) puedan ocasionar reacciones inespecíficas con antígenos presentes en otros microorganismos, generalmente también presentes en forma rugosa, acarrea ciertas dificultades en el diagnóstico (Carter, 1985).

La similitud antigénica existente entre *B. canis* y *B. ovis* propició el desarrollo de la prueba rápida de aglutinación en placa, para el diagnóstico de *B. canis* empleando un antígeno elaborado con una cepa de *B. ovis* y teñido con rosa de Bengala, *B. ovis* se ha usado también con el propósito de extraer antígenos solubles con el fin de usarlos en pruebas de inmunodifusión (Myers *et al.*, 1972; George y Carmichael, 1974).

Si bien existe una marcada predilección de *Brucella sp.* por el huésped natural, pueden producirse infecciones cruzadas con otras especies de animales domésticos o silvestres y adaptaciones al medio (Lucero *et al.*, 2005). Las brucelas rugosas estables (*B. canis* y *B. ovis*) presentan alto grado de especificidad de hospedador (Crespo, 1994; Lucero *et al.*, 2002).

## 2.9. GENETICA

El tamaño total del genoma se ha estimado en  $3,2 \times 10^6$  pares de bases; el ácido desoxirribonucleico (DNA) de *Brucella* contiene un 58-59% de guanina y citosina (Moriyón *et al.*, 2002). Se ha confirmado la presencia de 2 cromosomas circulares, uno de los cuales tiene el doble del tamaño que el otro (Lucero, 2000).

El análisis del ácido nucleico ribosomal (rRNA), la composición lipídica y aspectos de su fisiología y biología, ubican al género *Brucella* dentro de la subdivisión  $\alpha$ -2 de la Clase *Proteobacteria*, en la que están también otros patógenos intracelulares animales (*Rickettsias*), así como destacados patógenos y endosimbiontes de vegetales (*Agrobacterium* y *Rhizobium*) (Monroe *et al.*, 1975; Moreno *et al.*, 1990).

El género *Brucella* tradicionalmente se ha clasificado en seis especies: *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*, *B. ovis*, *B. canis* y *B. neotomae*, en función a la preferencia de hospedadores de los microorganismos. Sin embargo, la evidencia genética e inmunológica sugiere que todos los miembros del género *Brucella* están estrechamente relacionados, y algunos microbiólogos han propuesto que este género se reclasifique en una sola especie (*B. melitensis*), con las especies actuales bajadas a biotipos (CDC, 2011). Si bien los estudios de hibridación DNA-DNA determinaron que todos los miembros del género presentan más del 95% de homología, y es considerada un género monoespecífico (Verger *et al.*, 1985).

Por lo mencionado anteriormente la propuesta de los microbiólogos, es controversial y ambos sistemas taxonómicos están actualmente en uso (Porte *et al.*, 2003).

En mamíferos marinos también se ha logrado aislar *Brucella*, las cuales son genéticamente distintas al de las especies terrestres y, si se continúa con el sistema de denominación tradicional, se espera recibir los nombres de las especies. *B. maris* se sugirió originalmente para todas las cepas de *Brucella* en mamíferos marinos, con la subdivisión en dos o más biovars basados en la especificidad del hospedador; el biovar 1 incluye aislados de foca y nutria mientras que el biovar 2 contendría aislados en cetáceos. Una propuesta más reciente sugiere una división en, al menos, dos especies: *B. pinnipediae* para las cepas de pinnípedos (focas, leones marinos y morsas) y *B. cetaceae* para los aislados de los cetáceos (ballenas, delfines y marsopas). Otro esquema sugiere una división en tres grupos distintos formados por cepas de focas, marsopas y delfines (FAO, 2009).

Sin embargo hay estudios que indican que la estructura y organización genómica de una especie o aún de cada biovar dentro de una especie, tiene características únicas y distintivas, lo que sugiere que el género consiste en linajes clonales, cada uno adaptado en forma específica, aunque no exclusiva, a un huésped mamífero (Michaux-Charachon *et al.*, 1997; Jumas-Bilak *et al.*, 1998; Moreno *et al.*, 1990) (**Cuadro 7**)

**Cuadro 7. Clasificación antigua de las especies del género *Brucella* sp.**

ESPECIE	AÑO	MORFOLOGIA	BIOVAR	PATOGENICIDAD	HOSPEDERO
	DESCUBIMIENTO	COLONIAS		HOMBRE	NATURAL
<i>B. melitensis</i>	1887	Lisa	1	Alta	Cabras/ovinos
			2	Alta	
			3	Alta	
<i>B. abortus</i>	1897	Lisa	1	Moderada	Bovinos
			2	Moderada	
			3	Moderada	
			4	Moderada	
			5	Moderada	
			6	Moderada	
			7	Moderada	
			8	Moderada	
<i>B. suis</i>	1914	Lisa	1	Alta	Cerdos
			2	Sin notificación	Cerdos/Liebres
			3	Alta	Cerdos
			4	Moderada	Renos
			5	Alta	Cerdos
<i>B. ovis</i>	1953	Rugosa	-	Sin notificación	Ovinos
<i>B. neotomae</i>	1957	Lisa	-	Sin notificación	Roedores
<i>B. canis</i>	1968	Rugosa	-	Alta	Caninos
<i>B. pinnipediae</i>		Lisa	-	Baja	Focas
<i>B. cetaceae</i>		Lisa	-	Baja	Cetáceos

Fuente: López et al., 2007.

## 2.10. SENSIBILIDAD A DESINFECTANTES

El género *Brucella*, es sensible a los desinfectantes disponibles más comunes incluyendo, soluciones de hipoclorito, etanol al 70%, isopropanol, yodóforos, desinfectantes fenólicos, formaldehído, glutaraldehído y xileno; aun así la materia orgánica y las bajas temperaturas disminuyen la eficacia de los desinfectantes (Acha y Szyfres, 2003).

Los desinfectantes reportados para destruir brucelas en superficies contaminadas incluyen hipoclorito de sodio al 2.5%, 2-3% soda caústica, suspensión de hidróxido de calcio o solución formaldehído al 2% (todos examinados en 1 hora). Los compuestos de amonio cuaternario alcalino no son recomendados (Carter, 1985; Acha y Szyfres, 2003).

Estos microorganismos pueden también ser inactivados mediante calor seco (160-170°C por lo menos 1 hora); dejar hervir los líquidos por lo menos 10 minutos es usualmente efectivo (CDC, 2011). El autoclavado (temperatura mayor a 121°C por lo menos 15 minutos) puede usarse para destruir *Brucella* en material contaminados (Acha y Szyfres, 2003).

## 2.11. EPIDEMIOLOGIA

### 2.11.1. DISTRIBUCION GEOGRAFICA

La brucelosis canina es una enfermedad de distribución mundial, y se caracteriza por la presencia de aborto, epididimitis e infertilidad en caninos hembras y machos respectivamente (Carmichael y Greene, 2000). Es considerada además una zoonosis reemergente en varios países de América Latina, con nuevos casos reportados cada año, existiendo muchos casos subnotificados (Ángel *et al.*, 2012).

Uno de los primeros estudios llevados a cabo demostró la presencia de *B. canis* en un criadero de perros Beagle, donde la tasa de fertilidad disminuyó a 29% (Von Kruedener, 1976). Sin embargo, las tasas de presentación de *B. canis* en caninos domésticos resultó baja (0.2%) en comparación con la población canina de criaderos (Weber y Schliesser, 1978). En Italia, un estudio llevado a cabo en animales con problemas reproductivos crónicos demostró mediante análisis de PCR (*Polymerase chain reaction*) y serología la evidencia de *B. canis* (Corrente *et*

*al.*, 2010). En Hungría, un estudio realizado en un criadero de perros, demostró la presencia de *B. canis* mediante cultivo a partir de sangre, hisopados vaginales en 10% de los casos clínicos (Gyuranecz *et al.*, 2011).

La brucelosis canina es una enfermedad emergente en muchos países europeos, donde no era notificada previamente, como por ejemplo Austria, donde *B. canis* ha sido confirmado mediante Multiplex-PCR en un criadero de perros (Hofer *et al.*, 2012).

En Norteamérica, la brucelosis canina ha sido reportada principalmente en criaderos de perros; Data serológica de caninos del período 1995-2005, brindada por el Laboratorio Veterinario Diagnóstico de Wisconsin (WVDL) han demostrado un incremento en el número de casos de infección con *B. canis*, así como brotes en los estados de Wisconsin y Arkansas, asociado al transporte interestatal de perros infectados (Bower *et al.*, 2007). En Canadá, una encuesta serológica realizada en 2000 perros del Suroeste de Ontario, demostró 0.3% de seropositividad a *B. canis* (Bosu y Prescott, 1980). Mientras que en Quebec, 1.6% de 341 perros evaluados mediante aglutinación en mercaptoetanol resultaron positivos a *B. canis* (Higgins *et al.*, 1979).

La brucelosis canina es considerada una enfermedad endémica en muchos países de América Latina. En Colombia, un estudio realizado durante el año 2001-2002 determinó 20.3% de seropositividad a *B. canis* en perros de la ciudad de Bogotá (Cotrino *et al.*, 2003). Asimismo, un estudio serológico realizado en zonas de escasos recursos en Buenos Aires - Argentina demostró positividad a *B. canis* en 7.3% de la población canina muestreada (Boeri *et al.*, 2008). En Brasil, serología positiva a *B. canis* en un 20.6% ha sido reportada en criaderos de perros, en los cuales se presentó historia clínica de abortos, mortalidad neonatal y partos prematuros (Megid *et al.*, 1999). Por otro lado, (Almeida *et al.*, 2001) encontró un 14.2% de perros seropositivos en la ciudad de Alfenas, Brasil mediante la prueba de Inmunodifusión en Agar gel (IDAG) con antígeno de *Brucella ovis*. En el Perú, el primer estudio de brucelosis canina fue realizado por Reyes (1977), dicho estudio demostró un 28% de seropositividad a *B. canis* en perros de Lima metropolitana, mediante la prueba de aglutinación en Mercaptoetanol; sin embargo uno de los últimos estudios desarrollados en la provincia constitucional del Callao, la seroprevalencia de brucelosis canina ha sido estimada en un 15.57% (Ramírez, 2006).

## **2.11.2. ESPECIES SUSCEPTIBLES**

### **a) INFECCION NATURAL**

La enfermedad natural se ha identificado únicamente en perros y ocasionalmente en el hombre (Carmichael *et al.*, 1968).

Todas las razas caninas son susceptibles a la enfermedad, en un principio se pensó que los Beagles eran la única raza susceptible, pero actualmente se sabe que otras razas, así como cruces de razas, pueden sufrir la infección natural (Henderson *et al.*, 1974; Flores y Segura, 1975).

En el hombre la enfermedad ocurre en forma accidental, hasta el momento son pocos los casos de infección confirmados en él; la mayoría de ellos corresponden a infecciones en personal de laboratorio expuestos a dosis masivas de bacterias, o bien a personas con estrecho contacto con perros infectados ( Swenson, 1972). El ser humano es considerado un huésped moderadamente resistente a la infección por *B. canis*, ya que se necesita una exposición masiva de microorganismos para producir la enfermedad (Morales y Combariza, 2004)

### **b) INFECCION EXPERIMENTAL**

La infección experimental se ha investigado en diferentes especies: conejos, ratones, ratas y cobayos (Deyoe, 1970). En contraste con las especies clásicas *B. canis* es poco virulenta en estos animales, aun cuando la inoculen con dosis fuertes y por diferentes vías (Carmichael y Kenney, 1968)

Los conejos desarrollaron orquitis y abscesos peritoneales después de la inoculación por vía oral, conjuntival e intraperitoneal (Carmichael y Kenney, 1968; Randhawa *et al.*, 1977). Los bovinos y porcinos son sumamente resistentes a la inoculación por vía oral y conjuntival; sin embargo, las ovejas preñadas y no preñadas, expuestas por vía conjuntival, desarrollaron una

leve infección, asintomática y bacteremia e inducen formación de anticuerpos en bajas concentraciones (Pickerill, 1970). Los gatos fueron algo susceptibles, presentaron títulos de aglutinación por la vía oral, desarrollando solo un grado mínimo de bacteremia y anticuerpos, la mayoría de los gatos presentó títulos de 1:50 (Randhawa *et al.*, 1977; Carmichael y kenney, 1968).

### **c) ANIMALES SILVESTRES SUSCEPTIBLES**

La enfermedad ha sido poco estudiada en animales silvestres. Los zorros rojos (*Vulpes fulva*), se inocularon oralmente desarrollando bacteremia a partir de la 4<sup>ta</sup> a la 5<sup>ta</sup> semana post-inoculación, presentaron títulos de aglutinación positivos hasta la necropsia, esto fue después de 14 semanas de la inoculación (Pickerill, 1970). Las lesiones que presentaron fueron similares a la de los perros; lo que indica que el zorro es altamente susceptible a la brucelosis canina (Carmichael y kenney, 1978).

La infección experimental de *B. canis* en primates no humanos (*Macaca aractoides* y *Macaca mulatta*) ha sido ampliamente descrita (Moore y Gupta, 1968; Percy, 1972). Desarrollando hepatitis, focos granulomatosos, esplenitis, linfadenitis. En *M. aractoides* se produjo bacteremia durante 5 semanas y la bacteria no se pudo recobrar 7 semanas después de la inoculación. En contraste con los perros la inoculación por vía oral y conjuntival en monos no produjo lesiones en el tracto reproductivo (Percy, 1972; Carmichael, 1978).

Estudios serológicos realizados en carnívoros silvestres revelaron que la prevalencia en estos animales es baja (Hofer *et al.*, 2012). En 766 sueros de éstos, se encontraron resultados negativos: entre los animales estudiados se incluyeron zorrillos, zorros grises, zarigüeyas y lobos; en contraste, se obtuvieron títulos significativos de anticuerpos en sueros de gato montés, zorro rojo y coyote (títulos 1:200). Hasta el momento no se ha logrado el aislamiento de *B. canis* de casos de infección natural en animales silvestres (Carmichael y Kenney, 1968).

### **EN CONCLUSION:**

En resumen, los estudios realizados mostraron que los perros son más susceptibles, el zorro salvaje y los gatos presentan una susceptibilidad inferior a los perros, mientras que los ovinos, cerdos y bovinos son más resistentes a *B. canis*. No se debe olvidar que existe susceptibilidad en el humano de adquirir la brucelosis canina (Carmichael y kenney, 1968).



### 2.11.3. TRANSMISION

*B. canis* puede transmitirse mediante dos rutas: la ruta horizontal y vertical. La transmisión horizontal es la ruta principal de infección tanto para los perros susceptibles como para el ser humano (Méndez, 1998). *B. canis* es principalmente transmitida mediante fluidos vaginales de hembras infectadas, restos de placenta que contienen la bacteria, así como el semen y las secreciones urinarias de caninos macho infectados (Wanke, 2004). Por lo tanto, las principales rutas de entrada ocurren mediante transmisión venérea, oronasal, conjuntival y/o placenta. Los estudios sobre dosis mínima de infección indicaron aproximadamente  $10^6$  UFC/ml mediante ruta oral y  $10^3$ - $10^4$  UFC/ml mediante ruta conjuntival, desconociéndose la dosis de infección a nivel genital (Borie, 2002). Por otro lado, los perros infectados pueden permanecer con bacteriemia por un período mínimo de 4 años (CDC, 2011).

Los principales órganos de persistencia bacteriana son la próstata y el epidídimo a partir de los cuales grandes dosis de bacterias pueden ser transmitidas a hembras susceptibles (Flores y Carmichael, 1981).

La transmisión a humanos ocurre mediante el contacto con semen, orina y/o placenta, fetos abortados de animales infectados (Boeri *et al.*, 2008); por ello es considerada una enfermedad ocupacional en grupos humanos específicos, como por ejemplo médicos y técnicos veterinarios, aunque el real impacto de la enfermedad en salud pública es subestimado, debido a la falta de reportes médicos y a los servicios diagnósticos inadecuados (Lucero *et al.*, 2002) **(Cuadro 8)**

**Cuadro 8. Casos de brucelosis humana en América Latina 1977 – 2002**

<b>AÑO</b>	<b>2002</b>	<b>2001</b>	<b>2000</b>	<b>1999</b>	<b>1998</b>	<b>1997</b>
<b>COLOMBIA</b>	ND	27	ND	42	82	42
<b>ECUADOR</b>	ND	ND	0	5	10	5
<b>PERÚ</b>	991	372	1072	ND	1269	ND
<b>VENEZUELA</b>	ND	7	1	ND	3	11
<b>MÉXICO</b>	3013	3013	2171	2719	3550	3387
<b>ARGENTINA</b>	0	ND	507	353	ND	376
<b>CHILE</b>	12	11	9	21	4	ND

Donde: ND = No disponible.

Fuente: Morales y Combariza, 2004

Se ha considerado a los artrópodos como posibles diseminadores de varias especies de *Brucella sp.*, aunque desempeñarían un papel insignificante. La transmisión vertical se da mediante perras preñadas que transmiten la bacteria a sus crías, esto puede ocurrir mediante ruta placentaria o mediante la lactancia (Acha y Szyfres, 2003).

*B. canis* puede ser dispersado mediante fómites, en condiciones de alta humedad, bajas temperaturas y pocas horas luz. *Brucella sp.*, puede permanecer viable por varios meses en el agua, fetos abortados, heces, equipos e incluso ropas como se ha descrito previamente, la supervivencia de la bacteria se ve favorecida cuando las temperaturas son bajas (CDC, 2011)(**Cuadro 9**)

**Cuadro 9. Supervivencia de *Brucella* en el medio ambiente**

MATERIAL	TIEMPO DE
	SUPERVIVENCIA
Suelo y estiércol	80 días
Polvo	15 - 40 días
Leche a temperatura ambiente	2 - 4 días
Fluidos y secreciones en verano	10 - 30 minutos
Agua a 37 °C pH 7.5	menos de 1 día
Agua a 8 °C pH 6.5	más de 57 días
Fetos mantenidos a la sombra	6 -8 meses
Descarga vaginal mantenida en hielo	7 meses
Tierra húmeda a temperatura ambiente	66 días
Tierra desecada a temperatura ambiente	4 días

Fuente: Castro *et al.*, 2005

## **2. 12. PATOGENIE**

La infección por *B. canis* ocurre por contacto con animales infectados, ingestión de tejido placentario, fetos abortados y secreciones vaginales de hembras infectadas. Las rutas de ingreso más comunes se dan a través de la mucosa oral, nasal, conjuntival o genital; dependiendo de las rutas de ingreso el período de incubación varía (Xavier *et al.*, 2010).

Una vez que la bacteria ingresa es capaz de invadir y sobrevivir dentro de las células fagocíticas y no fagocíticas del hospedador (Pizarro *et al.*, 2000; Celi, 2006). Los macrófagos, células dendríticas y trofoblastos representan los blancos celulares de *B. canis*, lo cual concuerda con las manifestaciones clínicas de la enfermedad, con infección persistente de tejidos linfoides y lesión inflamatoria en el tracto reproductivo (Ficht, 2003).

Los macrófagos son las células encargadas de fagocitar a las bacterias; debido a la característica intracelular de *Brucella canis*, esta logra sobrevivir a la fagocitosis ya que inhibe la formación del fagolisosoma, permitiendo la supervivencia de la bacteria dentro de estas células que se van a encargar de diseminarla por el organismo, transportándola a los

órganos genitales y nódulos linfáticos regionales retrofaríngeos si la ruta de entrada fue oral e inguinales e iliacos si fue genital, en donde se adaptan al ambiente ácido y persisten a nivel intracelular, principalmente en el retículo endoplásmico rugoso (Espíndola, 2003). Se produce una linfadenopatía seguida por una bacteremia que empieza aproximadamente entre la primera y tercera semana post-infección y puede durar entre 6 a 64 semanas (Del Vecchio, 2001).

A pesar de los mecanismos de defensa realizados a nivel de los macrófagos infectados, como la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), acidificación del fagosoma, fusión del fagolisosoma y producción de citoquinas, *B. canis* logra sobrevivir en el interior del macrófago. Entre los mecanismos descritos destaca su capacidad de inhibir la formación del complejo fagolisosoma y la acción lítica de enzimas lisosomales (Arestégui *et al.*, 2001). Aún más interesante es la acidificación del fagolisosoma, la cual desencadena la expresión de genes bacterianos que resultan esenciales para la supervivencia intracelular (Porte *et al.*, 2003; Boschirolí *et al.*, 2002).

Entre las células blanco de *B. canis*, las células dendríticas (DC) resultan de gran importancia para su diseminación. Los estudios han demostrado que las DC presentan una mejor tolerancia al crecimiento bacteriano así como propiedades migratorias. Además *B. canis* puede inhibir la maduración de las DC y de esa forma modula la presentación de antígenos y secreción de citoquinas (Salcedo *et al.*, 2008).

Posterior a la propagación en las células del sistema inmune, *B. canis* se puede propagar a otros órganos como el hígado, glándula mamaria, testículos, próstata y útero, lugares en donde pueden desarrollarse focos granulomatosos (Carter, 1985). La afinidad de las bacterias del género *Brucella* por el sistema reproductor se debe principalmente a la presencia de eritritol en la placenta y líquidos fetales de las especies afectadas (Laing, 1991). El crecimiento de *Brucella sp.* dentro de las células trofoblásticas es mantenido principalmente por las elevadas concentraciones de eritritol durante el tercio final de la gestación (Samartino *et al.*, 1994; Samartino y Enrigh., 1996). Existe controversias en relación a la presencia de eritritol en la especie canina, en comparación a otras especies (Laing, 1991). Como resultado de la proliferación bacteriana la integridad de la placenta se ve comprometida, resultando en abortos o nacimiento de crías débiles. Además, los cambios hormonales ocasionados incrementan las

concentración de prostaglandina 2 $\alpha$ , estrógeno y cortisol, comprometiendo aún más la gestación (Gorvel y Moreno, 2002).

El útero de perras no preñadas, no es el sitio ideal para el crecimiento de la bacteria, aunque en las hembras gestantes, el útero es un sitio ideal de infección, infectando así al feto por la vía placentaria. (Carmichael y Kenney, 1968). En una hembra preñada, los organismos probablemente invaden el feto por la vía placentaria, sin embargo la alta concentración de bacterias en los fluidos amnióticos y la presencia de leucocitos en el lumen del estómago e intestinos de los fetos abortados, sugiere que la infección fetal ocurre como resultado de la ingestión de fluidos amnióticos, la cual finalmente produce el aborto (Cotrino *et al.*, 2003). También se tienen otras teorías como que en las hembras gestantes las bacterias se alojan en la placenta, disminuyendo el aporte de oxígeno al feto, teniendo como consecuencia la reabsorción embrionaria si la muerte ocurre en el primer tercio de la gestación y si la bacteria invade el epitelio trofoblástico que envuelve al embrión a los 45 días de preñez produce una placentitis que finalmente conduce al aborto (Borie, 2002).

En perras que han abortado, las brucelas han estado presentes en grandes cantidades en las descargas vaginales (uterinas), y como se ha mencionado, las descargas vaginales continúan por varias semanas, siendo este material excretado la fuente más común de transmisión hacia otros animales (Carmichael y Kenney, 1968)

El análisis de la patogenia en el aparato reproductor de los perros infectados señala que se trata de una respuesta autoinmune a la colonización de *B. canis* en el tracto genital (Serikawa *et al.*, 1984).

## **2.13. INMUNIDAD**

La infección induce respuestas inmunes principalmente mediadas por células, ya que dependen de la activación de los macrófagos, las cuales varían por factores tales como patogenicidad de la cepa infectante, edad, estado nutricional, tratamientos previos con antibióticos y estado inmune del huésped (Cotrino *et al.*, 2003).

La mayor actividad que ejercen los macrófagos para eliminar a la bacteria se debe a un tipo de interleucina, la linfoquina, que es liberada por los Linfocitos T específicos, una vez que

son reconocidos por el antígeno bacteriano y los componentes del complejo mayor de histocompatibilidad en la superficie del macrófago (González *et al.*, 2004)

Los anticuerpos circulantes también desempeñan cierto papel en la inmunidad pero existe poca correlación entre los títulos de anticuerpos y el grado de resistencia. Después de la infección, aumentan las IgM (detectable en las primeras semanas post-infección empezando a disminuir a los 3 meses) y la IgG comienza a aumentar en la segunda semana de enfermedad y dura por lo menos un año en pacientes no tratados, disminuyendo hacia el sexto mes si existe tratamiento. Si hay aumento persistente. Se atribuye a la presencia de microorganismos intracelulares viables en tejido reticuloendotelial o focos de infección (Cotrino *et al.*, 2003).

## 2.14. SIGNOS CLINICOS

*B. canis* es una de las enfermedades infecciosas que ocasionan la mayor cantidad de desórdenes reproductivos en caninos domésticos y silvestres (**Cuadro 10**). Los signos clínicos varían desde animales asintomáticos a severos (Hollet, 2006). La morbilidad es alta mientras que la mortalidad es baja (Megid *et al.*, 1999).

Cuadro	CARACTERÍSTICA	AÑO		10.
		NORMAL	POST INFECCION	
Efecto la	Abortos	1	19	de
	Falla en la concepción	4	15	
	Reabsorción embrionaria	0	8	

### brucelosis canina sobre los índices reproductivos

<b>Cruzas exitosas (%)</b>	91.40% (53/58)	28.80% (17/59)
<b>Cachorros nacidos</b>	282	74
<b>Cachorros/hembra/año</b>	5.7	1.5

Fuente: Pollock, 1980

El signo clínico característico de la brucelosis canina es la presencia de abortos tardíos, el cual ocurre en promedio a las 45 a 50 días en el 75% de los casos clínicos, y se presenta además con descargas vaginales mucoides, serosanguinolentas o grisáceas que pueden persistir hasta por seis semanas (Shin y Carmichael, 1999; Hollett, 2006). Las hembras infectadas pueden presentar abortos consecutivos, o tener camadas débiles o aparentemente normales, que mueren pocas horas o hasta un mes posterior al parto (Wanke, 2004).

La brucelosis canina no altera la presentación del estro y/o celo (Hollett, 2006). La mortalidad embrionaria puede pasar desapercibida, y el diagnóstico se realiza usualmente mediante consulta médica por fallas en la concepción (Carmichael y Shing, 1996). Además no se ha observado susceptibilidad dependiente de la edad en las hembras, aunque la mayor tasa de presentación ocurre entre los 2 a 4 años de edad, la cual es la edad óptima para la reproducción (Kirk, 1997).

La sintomatología clínica en caninos machos infectados está relacionada a su tropismo por los órganos andrógeno-dependientes. Las principales manifestaciones clínicas incluyen severa epididimitis, orquitis y prostatitis (Megid *et al.*, 1999). La epididimitis ocurre por lo general a las 5 semanas post infección y se caracteriza por el crecimiento del órgano, acompañado de dolor y por la presencia de fluido serosanguinolento en la túnica. La dermatitis escrotal es consecuencia del lamido de la zona, lo cual conlleva al desarrollo de edema y dermatitis y contaminación secundaria con *Staphylococcus sp.* (Wanke, 2004; Hollett, 2006).

La teratospermia y otras alteraciones de los espermatozoides como deformación acrosomal y unión de espermatozoides entre las 18 y 27 semanas post infección. La observación microscópica indica presencia de macrófagos con células espermáticas fagocitadas, rodeado por masas de neutrófilos. En fases crónicas, la ausencia de espermatozoides o disminución en su número se acompaña con una reducción del tamaño del testículo. *B. canis* puede persistir en la próstata y epidídimo, pudiendo ser diseminada mediante fluido seminal u orina (Shin y Carmichael, 1999).

Algunos perros con atrofia testicular son fértiles, otros manifiestan disminución del libido en grado variable y en caso de atrofia testicular bilateral, generalmente son estériles (Cottrino *et al.*, 2003). Debido que al momento del daño tisular por *B. canis*, existe liberación de autoantígenos desarrollados durante la vida fetal que son percibidos como extraños por el sistema inmune del adulto, se produce una enfermedad autoinmune con el consecuente desarrollo de orquitis, encontrándose a nivel sanguíneo, anticuerpos contra los espermatozoides los que estimulan a su vez, la producción de autoanticuerpos tipo IgG o IgA, causantes de la aglutinación e inmovilización de los espermatozoides, produciendo finalmente infertilidad en machos (Carmichael, 1978; Tizard, 2008)

Otros signos clínicos asociados a bacteriemia en perros infectados son discoespondilitis, meningitis, encefalitis no supurativa, osteomielitis y uveítis (Anderson y Binnington, 1983; Smeak *et al.*, 1987; Vinayak *et al.*, 2004). La discoespondilitis es acompañada por dolor agudo de la columna vertebral, paresis, parexia y compresión medular (Anderson y Binnington, 1983). La uveítis crónica o recurrente en ausencia de enfermedad sistémica usualmente es unilateral con hiperpigmentación del iris, infiltrado vítreo y corioretinitis (Ledbetter *et al.*, 2009).

La sintomatología observada en animales pre púberes es caracterizada por la linfadenopatía generalizada. Además de los nódulos linfáticos, *B. canis* puede ocasionar lesiones granulomatosas en el bazo y el hígado (Wanke, 2004). Otros signos no específicos incluyen letargia, pelaje hirsuto, intolerancia al ejercicio, pérdida de peso, pérdida de libido y cambios de conducta (Shin y Carmichael, 1999; Wanke, 2004).

## **2.15. HALLAZGOS HISTOPATOLOGICOS**



Morfológicamente, la enfermedad causada por *B. canis*, invade los tejidos del sistema reticuloendotelial, y vasos sanguíneos de órganos del tracto reproductivo; los linfocitos, células plasmáticas y reticulares son las células principalmente involucradas, dando reacciones de hiperplasias de células reticulares de los órganos linfoides con infiltración de linfocitos, macrófagos, y células plasmáticas así como la formación de granulomas (Carmichael y Kenney, 1968). Una lesión que se considera única para infecciones crónicas de *Brucella* es la presentación de meningitis y encefalitis no supurativas (Carmichael y Kenney, 1968).

Las lesiones post-mortem, incluyen linfadenopatía generalizada, esplenomegalia, cualquier órgano puede verse involucrado, las placas de Peyer siempre están afectadas, en el centro tienen un alto índice mitótico y de vez en cuando hay infiltración de neutrófilos. Las áreas corticales de los nodos linfáticos y la pulpa blanca del bazo presentan acumulaciones focales o difusas de células reticulares con hiperplasia de linfocitos en la unión cortico medular, haciéndose prominentes los sinusoides de la médula, existiendo agrandamiento medular en la zona central por la invasión de plasmocitos (Carmichael y Kenney, 1968).

También tenemos que se presentan lesiones focales en la corteza renal con fibrosis intersticial, engrosamiento de la membrana basal y hialinización de algunos glomérulos (Scheftel, 2003).

#### **2.15.1. EN HEMBRAS**

Cuando recién han abortado, presentan hipertrofia glandular del útero con infiltración de la lámina propia por linfocitos y formación de granulomas con infiltración de neutrófilos. Una lesión importante es la presencia de restos de placenta en el útero, presentando necrosis focal coagulativa de las vellosidades coriónicas (Ramírez, 2006), así como vulvitis (Carmichael y Kenney, 1968).

#### **2.15.2. EN MACHOS**

Se presenta epididimitis, orquitis, dermatitis escrotal, e infiltración linfocitaria en la próstata, con destrucción del tejido glandular, degeneración de túbulos seminíferos con espermatogonias y células de Sertoli en el lumen, en casos severos hay pérdida de los túbulos seminíferos los cuales son sustituidos por tejido de tipo fibroso (Carmichael y Kenney, 1968;

Ramírez, 2006). La epididimitis es más frecuente que la orquitis y que la orquitis asociada a epididimitis (Laing, 1991). La inflamación de estos órganos no es supurativa, observándose, además, espermatozoides en el espacio extra tubular ya sea a nivel intersticial o peritubular (Carmichael, 1998).

En testículos se ha descrito atrofia, proliferación de linfocitos, células plasmáticas y tejido reticular, además de arteritis necrotizante y vasculitis (Spink, 1970). En suma, se produce un cambio degenerativo testicular, así como también se encontró engrosamiento de la túnica albugínea (Scheftel, 2003).

No se conoce bien la razón por la cual la bacteria coloniza preferentemente el tejido epididimario, pero se ha asignado importancia a la anatomía de los vasos sanguíneos y a una marcada adhesividad que poseen las brucelas rugosas a la superficie celular (Foster, 2003).

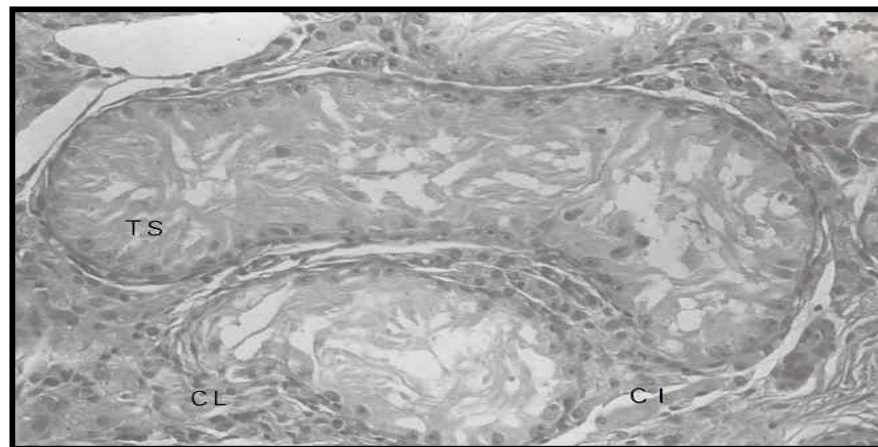
La epididimitis ocurre a partir de la 3° - 5° semana de infección; es causada por la acumulación de células inflamatoria, como son los linfocitos, neutrófilos y macrófagos que se observan en los conductos deferentes (Scheftel, 2003), también se caracteriza por la infiltración de células mononucleares, fagocitosis espermática por los macrófagos y multiplicación de células gigantes, así como la producción de anticuerpos y aglutinación espermática. (Jones y Brinley, 1958)

Dentro de las anormalidades espermáticas más frecuentes que explicarían la infertilidad característica de los machos infectados con *B. canis*, se señalan células espermáticas inmaduras, retención de gota citoplasmática proximal, presencia de colas enrolladas, desprendimiento de cabezas y aglutinación cabeza-cabeza (George y Carmichael, 1974), ya que estas alteraciones impiden el normal desplazamiento de los espermatozoides hacia el sitio de fecundación o la adecuada interacción gamética (Reyes, 1977).

En el análisis histológico de un perro azoospermico, se muestran alteraciones severas de la línea espermatogénica en todos los túbulos seminíferos. En la mayoría de ellos la diferenciación celular progresó sólo hasta espermátocitos primarios y en ninguno se observó

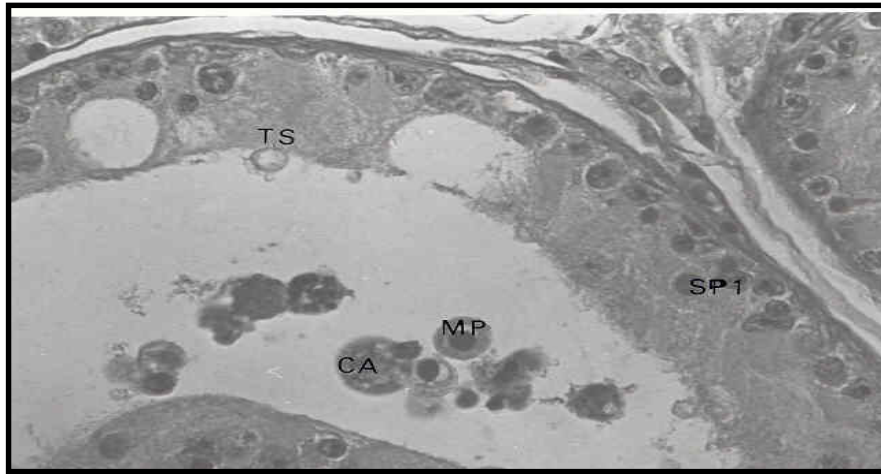
espermátidas ni espermatozoides (**Figura 3**). Algunos túbulos seminíferos estaban formados exclusivamente por células de Sertoli y otros en franco proceso degenerativo. En general las membranas basales se observaron alteradas (engrosadas o discontinuas). También se encontraron hemosiderófagos en los túbulos seminíferos, indicando destrucción de glóbulos rojos. Todo esto, además de la presencia de eritrocitos en el lumen (**Figura 4**), indica una alteración a nivel de la barrera hematotesticular o ruptura tubular (Borie, 2002). Al respecto, Carmichael (1998), señala la salida de espermatozoides a través de los túbulos seminíferos en perros que cursan con orquitis.

**Figura 3. Microscopia Túbulos Seminíferos**



*Túbulos seminíferos (TS) con predominio de células de Sertoli y ausencia de desarrollo de la línea germinativa. Compartimento intersticial (CI) con presencia de células de Leydig (CL) de apariencia normal (Tinción hematoxilina-eosina, 300X). Fuente: Boeri, 2002*

**Figura 4.**



*Túbulos seminíferos 1 (TS1), presencia de glóbulos rojos y blancos en el lumen y células descamativas del epitelio, vacuolización de algunos segmentos epiteliales, engrosamiento parcial del peritúbulo (Tinción hematoxilina-eosina, 300X). Fuente: Boeri, 2002*

La alteración de la red hematotesticular implica que determinantes antigénicos espermáticos pasen a la circulación periférica desencadenando una respuesta autoinmune en el animal (Rhoades y Meslin, 1980). La salida de espermatozoides explicaría una autosensibilización con aparición de anticuerpos antiespermáticos y reacciones de hipersensibilidad tardía contra antígenos de estas células, situación que contribuye a perpetuar la orquitis-epididimitis y detener la espermatogénesis, pudiendo provocar azoospermia en casos crónicos ( George y Carmichael, 1974; Serikawa *et al.*, 1984)

### **2.15.3. EN FETOS**

Presentan congestión y hemorragia en diferentes órganos, acumulación perivascular de linfocitos en hígado (Orduña *et al.*, 2001). A menudo, la placenta y los fetos presentan autólisis (Nelson y Couto, 1995). Otras lesiones que se observan en fetos abortados son bronconeumonía, miocarditis, hemorragias focales en riñón con infiltración linfocitaria y células reticulares en el intersticio y tejido perivascular de la pelvis renal, linfadenitis y hepatitis. (Ramírez, 2006; Briseño *et al.*, 2004)

## **2.16. DIAGNOSTICO**

### **2.16.1. DIAGNOSTICO CLINICO**

Los signos clínicos no son los indicados para establecer un diagnóstico (Carmichael, 1978). Debido a esto, es necesario que se realicen otros métodos de diagnóstico (Flores y Carmichael, 1981). Aun así habría que considerar los abortos, lesiones testiculares, óseas y articulares como signos sugestivos de la enfermedad (Carmichael y Shin, 1996).

### **2.16.2. DATOS DE LABORATORIO**

Los valores hematológicos y bioquímicos son alterados de manera inespecífica en brucelosis canina. Los casos crónicos están asociados con hiperglobulinemia ( $\beta$  y  $\gamma$ ) e hipoalbuminemia concomitante. Las muestras de aspirados de ganglios linfoides suelen demostrar hiperplasia e incremento de células plasmáticas. El análisis de orina usualmente es normal, a pesar de la presencia de bacteriuria (Carmichael y Greene, 2000).

### **2.16.3. EXAMEN DE SEMEN – ESPERMATOGRAFÍAS**

Es importante realizarlo en los machos, que presentan anormalidades en la calidad espermática, más no hay pérdida de libido, pero si hay disminución en el volumen de eyaculado (Carmichael y Greene, 2000); dichas anormalidades son características pero no específicas a infección de *B. canis*. Las anormalidades, que se presentan a las 5-8 semanas post infección, son la presencia de espermatozoides inmaduros, acrosomas deformes y retención de la gota protoplasmática. Después de 15 semanas, los espermatozoides presentan colas dobladas, cabezas separadas y aglutinación de cabeza con cabeza (causada por anticuerpos antiespermáticos) (Ettinger, 2002), durante las semanas 60-100 después de adquirir la infección, hay pocas células inflamatorias, la motilidad es de 60-70% (el promedio de motilidad normal es de 85%) con un 50-70% de espermatozoides anormales (los espermatozoides anormales deberían estar en menos del 20%) (Fitch, 2003); anormalidades morfológicas; disminución en el número de espermatozoides y en el volumen seminal, más del 90% de espermatozoides son anormales, lo que indica una progresión de anormalidades espermáticas, en

donde los animales con curso crónico llegan a ser azoospermicos (Carmichael 1978; Shin y Carmichael 1999)

#### **2.16.4. MICROSCOPIA**

La observación microscópica puede ser realizada a partir de improntas de muestras de fluidos de animales infectados como por ejemplo las secreciones vaginales post aborto, placenta, tejidos fetales y semen (Galina, 1988; Vadillo *et al.*, 2002). La observación microscópica de bacilos o cocobacilos pequeños de coloración rojiza es un indicativo de la presencia de *Brucella* sp. Si bien la observación microscópica es una técnica fácil de realizar, rápida y económica, presenta bajos niveles de sensibilidad y especificidad, por lo que debería siempre ir acompañado de pruebas complementarias como por ejemplo, el cultivo bacteriano (Vadillo *et al.*, 2002).

#### **2.16.5. SEROLOGÍA**

El uso de las pruebas serológicas es el método utilizado con mayor frecuencia para el diagnóstico de brucelosis canina. Sin embargo, ha sido considerada una prueba con gran margen de error debido a la reacción cruzada de los LPS de muchas especies bacterianas con *B. canis*. Además, muchos antígenos somáticos de *B. canis* son comunes con otras especies bacterianas como: *Bordetella bronchiseptica*, *Pseudomona aeruginosa* (Carmichael y Greene, 2000).

El diagnóstico serológico de brucelosis causada por *B. canis* se realiza utilizando antígenos proteicos o preparados con R-LPS, en este último la especificidad está dada por el PS (Lucero *et al.*, 2005). Debido a que *B. canis* y *B. ovis*, se encuentran en fase rugosa privadas de la cadena O del antígeno de superficie del LPS que caracteriza a las brucelas en fase lisa, se debe de contar con el antígeno específico ya que no posee reacción cruzada con ellas (Carmichael *et al.*, 1989).

Entre los problemas que presenta el serodiagnóstico de *Brucella canis*, son la contaminación de muestras, sueros hemolisados, sueros de perros tratados con antibióticos para combatir la infección, presentando así, incapacidad para detectar títulos bajos de infecciones crónicas (Carmichael, 1978).

Es importante considerar que los sueros no deben estar hemolisados ya que la hemoglobina ocasiona aglutinación falsa del antígeno en el tubo de ensayo (Carmichael y Greene, 2000).

Si se desea realizar una prueba serológica a estos animales con tratamiento antibiótico, es necesario esperar aproximadamente 4 semanas después del cese del tratamiento (Carmichael, 1978). Muchas veces, los perros presentan títulos de anticuerpos insignificantes a pesar de presentar bacteremia, en tanto otros, dan resultados positivos como consecuencia de las reacciones heterólogas con otras bacterias (Martin y Casal, 1994). Por tal motivo, el serodiagnóstico de *B. canis* es difícil ya que su morfología es de naturaleza rugosa y ello genera reacciones cruzadas entre la pared celular por su componente lipopolisacárido y éste a su vez con otras especies de bacterias (Carmichael *et al.*, 1989).

La infección por *B. Canis* produce anticuerpos que son detectables por pruebas serológicas a partir de la octava semana post infección, debido a que la primera fase de la respuesta inmune predomina la IgM que va siendo paulatinamente superada por la IgG, la que es característica de enfermedad crónica (Cotrino *et al.*, 2003).

Entre las principales pruebas de diagnóstico serológico utilizadas para la detección de anticuerpos a *B. canis*, las podemos dividir en dos grupos: Las pruebas de rutina y las pruebas confirmatorias.

#### **a) PRUEBAS DE RUTINA**

##### **1. Aglutinación Rápida en Placa (PARP / RSAT)**

La prueba de aglutinación rápida es una prueba de tamizaje (screening) desarrollada en 1974, la cual es muy práctica, dado que los resultados son obtenidos dentro de 2 minutos (George y Carmichael, 1974). La prueba utiliza antígeno de *B. ovis* debido a las características propias entre ambas especies (se encuentran en fase rugosa y no presentan cadena O) y

principalmente porque la preparación de antígenos aglutinantes es más estable en *B. ovis* que en *B. canis* (Brown *et al.*, 1976).

La prueba permite la detección de anticuerpos contra *B. canis* entre las 3 a 4 semanas post infección. Los resultados de la prueba de RSAT indican altos niveles de sensibilidad, pero bajos niveles de especificidad, debido principalmente a la presencia de falsos positivos (Brown *et al.*, 1976; Flores y Carmichael, 1981).

El ensayo de RSAT no debe ser considerado para el diagnóstico definitivo de brucelosis canina ya que se ha observado reacciones cruzadas entre los anticuerpos IgG y IgM dirigidos contra antígenos de pared celular de *B. ovis* y otras especies relacionadas a *Bordetella*, *Pseudomona* y *Moraxella* (Carmichael, 1998).

## **2. Aglutinación Rápida en Placa 2-Mercaptoetanol (PARP-2-ME)**

Es una variante de la prueba de aglutinación rápida en la cual se adiciona gotas de Mercaptoetanol para inactivar la IgM de reacción cruzada y de ese modo incrementar la especificidad de la prueba. Además el antígeno de *B. ovis* es reemplazado por el de *B. canis* para reducir los falsos positivos (Badaksh *et al.*, 1982). La prueba es considerada semi-cuantitativa. Entre los inconvenientes de la prueba está el hecho de que un animal puede permanecer hasta 30 meses luego de estar abacterémico, aunque falsos negativos también pueden aparecer a las 8 primeras semanas post infección (Hollett, 2006).

## **3. Seroaglutinación en tubo (SAT)**

El ensayo de aglutinación en tubo (SAT) es un método semi-cuantitativo que detecta anticuerpos contra *B. canis* en animales que inicialmente fueron positivos a RSAT y ME-RSAT. La solución antigénica utilizada en esta prueba es una suspensión de antígeno de *B. canis* inactivado por calor. Evidencia presuntiva de infección activa ocurre por encima de 1:200 (Fredickson y Barton, 1974; Rhoades y Mesfin., 1980). Por otro lado, pacientes con títulos por debajo de 1:200 debería ser reevaluados 2 semanas después. La prueba es sensible pero poco específica. A pesar de que las pruebas de SAT, RSAT y ME-RSAT detectan anticuerpos contra *B. canis*, estos anticuerpos no son protectivos, debido a que animales con serología positiva, pueden permanecer con períodos prolongados de bacteriemia (Hollett, 2006).



#### **4. Seroaglutinación en tubo 2 – Mercaptoetanol (SAT - 2 - ME)**

Es una prueba muy similar a la PARP-ME ya que también utiliza al 2-Mercaptoetanol para aumentar su sensibilidad. Utiliza antígeno de pared celular y nos proporciona resultados positivos a las 5 – 8 semanas post infección hasta que el animal ya no posee bacteremia (Shin y Carmichael, 1999). Es una prueba semicuantitativa de mayor sensibilidad que la seroaglutinación en tubo, pero tiene el inconveniente de proporcionar resultados falsos positivos (Shin y Carmichael, 1999).

### **c) PRUEBAS CONFIRMATORIAS**

#### **1. Inmunodifusión en Agar Gel (IDAG)**

La prueba de IDAG, es utilizada como prueba confirmatoria en casos positivos mediante RSAT, ME-RSAT y SAT (Flores y Carmichael, 1981). Esta prueba tiene una sensibilidad de 91.7% y una especificidad de 100% en el diagnóstico de brucelosis bovina (Myers *et al.*, 1972). Se caracteriza por ser de fácil procesamiento e interpretación; ofreciendo además, la ventaja de ser de bajo costo (Véliz *et al.*, 1974). Es una prueba de procedimiento sensible para el serodiagnóstico de brucelosis canina, ya que demuestra las precipitinas en el suero de perros infectados 5 – 10 semanas posteriores a la infección y los anticuerpos persisten varias semanas o meses después de que la bacteremia cesa (Carmichael y Craig, 1993).

La prueba de IDGA consiste en una reacción de precipitación entre el antígeno y el anticuerpo que se difunden uno hacia otro a través de un gel de Agar formando bandas visibles de precipitación (Tizard, 1998). Su lectura se realiza a las 24, 48 y 72 horas, lo que sería una desventaja en exámenes previos a la cruce (Borie *et al.*, 2008).

Esta técnica emplea un antígeno que contiene un lipopolisacárido rugoso, específico para brucelas rugosas y que no da reacciones cruzadas con otras especies de *Brucella* en su forma lisa (Véliz *et al.*, 1974). Por sus altos valores de sensibilidad y especificidad, se ha utilizado esta prueba para diagnosticar brucelosis canina en estudios similares (Almeida *et al.*, 2001; Megid *et al.*, 1999).

Existen dos métodos de IDGA: el que utiliza antígenos de pared celular (IDGA – LPS – *B. canis* y *B. ovis*) y el que utiliza antígenos de proteínas citoplasmáticas (IDGA – PC – *B. canis*) (Carmichael, 1998; Carmichael y Greene, 2000).

El IDGA – LPS no es tan fácilmente utilizable cuando se usa también R-SAT o la SAT, pues la preparación del antígeno y la lectura de los resultados son más complejos. Aun siendo más específico que 2ME- RSAT, las reacciones cruzadas con otros microorganismos puede ocurrir. Además de ese hecho, la interpretación del resultado es subjetiva, por eso no se emplea como método cuantitativo.

La prueba de inmunodifusión utilizando antígeno citoplasmático (IDGA-PC), actualmente, es el método más específico para la detección de *Brucella sp* rugosas. Utiliza extracto proteico del citoplasma bacteriano de *B. canis*. (M-) y presenta menor proporción de reacciones cruzadas. Una gran ventaja de la IDGA utilizando antígenos citoplasmáticos es la posibilidad de diagnosticar animales crónicamente infectados, permitiendo la detección de anticuerpos circulantes hasta 36 meses después que la bacteremia ha cesado cuando otras pruebas presentan resultados negativos (Moriyón *et al.*, 2002).

Como los antígenos citoplasmáticos de *B. canis* serán comunes a otras especies de *Brucella*, el IDGA-PC presenta reacciones positivas cuando las infecciones son causadas por *B. suis*, *B. abortus* y *B. ovis*. Aun así, ese hecho no es de gran interés clínico, pues las infecciones por otras brucelas raramente ocurren en perros (Michaux-Charachon *et al.*, 1997)

La IDGA – *B. canis* utilizado en paralelo con la IDGA – *B. ovis* aumenta la eficacia y la confiabilidad de diagnóstico serológico de brucelosis canina, pudiendo ser recomendado como examen confirmatorio para el diagnóstico de la enfermedad (Moriyón *et al.*, 2002).

## **2. Prueba de Anticuerpo Fluorescente Indirecto (IFA)**

Los test de IFA y ELISA han sido utilizados como alternativas diagnósticas, ante la inseguridad de los resultados de las pruebas rápidas de aglutinación. Debido a que la sensibilidad del IFA es incierta, algunos perros infectados podrían no ser diagnosticados (Carmichael y Greene, 2000).

### **3. Ensayo Inmunoabsorbancia ligado a enzimas(ELISA)**

Para el diagnóstico de brucelosis canina se utiliza una ELISA indirecta, la cual busca detectar anticuerpos que pueden estar presentes en el suero de animales sospechosos. Esta prueba detecta IgG e IgA, las cuales son bastante útiles para evaluar el estado clínico del perro (Wanke, 2004; Lucero, 2000).

Esta prueba utiliza antígeno de pared celular que permite cuantificar los anticuerpos específicas IgM, IgG e IgA, siendo muy específica pero menos sensible que la seroaglutinación en tubo. Tiene elevado costo y su falta de estandarización en cuanto al tipo de antígeno hace difícil comparar los resultados de un laboratorio con otro, eliminando la posibilidad de discernir entre curación y evolución a cronicidad (Celi, 2006)

El uso potencial de la prueba de ELISA ha sido comprobado en estudios realizados en pacientes humanos. El diagnóstico se basa en el uso de un formato indirecto de ELISA que permite la detección de anticuerpos en pacientes negativos a pruebas de antígenos, pero positivos a pruebas de aglutinación rápida (Lucero *et al.*, 2005). Debido a que la prueba presenta altos niveles de sensibilidad y especificidad, ha sido considerada como una prueba confirmatoria para pacientes humanos con diagnóstico previo mediante RSAT (Lucero *et al.*, 2005), así como para perros con diagnóstico previo mediante ensayos de aglutinación (Lucero, 2000; Madkour, 2001).

### **4. Reacción en cadena de Polimerasa (PCR)**

Es un método *in vitro* que se sintetiza secuencias definidas de enzimas de DNA, siendo rápido, sensible y específico para la identificación, ya que sintetiza *in vitro* secuencias específicas de DNA bacteriano (Estein, 1999).

El PCR es útil para muestras de sangre, suero, leche y semen. En efecto la sangre es ideal para detectar la infección debido a la prolongada bacteremia característica de *B. canis* (Keid *et al.*; 2007 <sup>a,b</sup>)

En algunos trabajos se menciona una sensibilidad alta (100%) y especificidad (98.5%); de fácil y rápido ejecución, no obstante la interferencia de algunos elementos hemáticos se ha considerado un factor limitante de su sensibilidad (Espíndola, 2003).

## **5. Fijación de complemento**

Es una técnica sensible y específica, detecta anticuerpos del tipo IgG. Es una técnica laboriosa (Lucero *et al.*, 2005).

Considerada como la más específica pero resulta muy laboriosa, complicada e intervienen muchos factores; además a nivel mundial no se encuentra estandarizada (Acha y Szyfres, 2003)

### **2.16.6. CULTIVO BACTERIANO**

El cultivo bacteriano es el único método de diagnóstico definitivo para resolver las diferencias serológicas, siendo la sangre la mejor fuente para aislar el microorganismo, utilizándose sangre con anticoagulante, como heparina y citrato, y no con EDTA ya que inhibe el crecimiento de *B. canis* (Ettinger, 2002; Keid *et al.*, 2007<sup>a</sup>).

La presencia de microorganismos se puede detectar en sangre a partir de la tercera a cuarta semana post infección y puede durar hasta 1 año o más en el 80 a 100 % de los animales, presentándose de una forma intermitente e incluso los animales crónicos pueden llegar a ser persistentemente no bacterémicos (Carmichael y Greene, 2000). El hemocultivo permite el diagnóstico de infecciones tempranas, teniendo en cuenta que en las primeras 4 semanas post infección las pruebas serológicas y los cultivos de semen y orina son aun negativos (Espíndola, 2003). Debido al bajo número de bacterias que circulan en la porción leucocítica de la sangre, usualmente se requieren múltiples muestras de sangre. Además el cultivo directo es difícil de realizar, debido a que *B. canis* es un organismo difícil de obtener, principalmente si el paciente ha recibido antibioticoterapia previamente (Hollett, 2006).

Los tejidos ideales para el aislamiento son hígado, bazo, próstata, nódulos linfáticos, orina y las descargas vaginales; y con menor frecuencia se reportan aislamientos a partir de semen, leche y calostro. En tejidos placentarios y fetales poseen alta concentración de microorganismos tales como pulmón, bazo, hígado, nódulos linfáticos, sangre y principalmente estomago e intestinos, sugiriendo que la infección fetal puede ocurrir por la ingesta de fluido amniótico (George y Carmichael, 1974; Cotrino *et al.*, 2003; Ettinger, 2002)

Los hisopados vaginales son útiles únicamente cuando existe descarga vaginal. A partir de semen se tiene la mayor sensibilidad entre la tercera y sexta semana post infección, ya que a partir de ese periodo el número de microorganismos empieza a disminuir hasta llegar a la semana sesenta donde el resultado será negativo aun cuando el animal continúe infectado, sin embargo el éxito del aislamiento a partir de la eyaculación manual no es muy exitoso (Espíndola, 2003)

El éxito del aislamiento depende de la viabilidad del microorganismo y de la fase de infección, por lo que un resultado negativo no excluye la posibilidad de infección, debiéndose hacer una colecta de 3 muestras consecutivas con al menos 24 horas de intervalo (Galina, 1988)

## **2.17. TRATAMIENTO**

Durante años el tratamiento de la brucelosis canina ha sido considerado poco alentador. Como se sabe, la bacteria es secuestrada principalmente dentro de los macrófagos por un gran período de tiempo, y la bacteriemia es episódica (Hollett, 2006). En el caso de la brucelosis en perros de criaderos, el tratamiento no está indicado, sino la eliminación del animal debido a su capacidad de servir como reservorio de la infección. Por otro lado, en animales de compañía, la decisión del sacrificio o el tratamiento de los animales depende del tipo de lesión, de la cronicidad de la enfermedad, de los cuidados por parte de los propietarios así como de monitoreo de los animales (Foster, 2003).

Diferentes estudios llevados a cabo han demostrado que el régimen de tratamiento con un solo antibiótico es insuficiente y no es recomendado (Jeannings *et al.*, 1974; Carmichael y Greene, 2000). Los mejores resultados han sido obtenidos mediante la combinación de antibióticos de la familia de las tetraciclinas (Tetraciclina HCl, Clortetraciclina, Doxyciclina y

Minociclina) y Dihydroestreptomicina o Gentamicina, con tasas de recuperación de hasta el 80% en criaderos.

Dentro de las desventajas del uso de antibióticos está el alto costo de tratamientos, el tiempo prolongado del tratamiento con las consecuentes alteraciones en los pacientes (como por ejemplo el fallo renal asociado al uso de los aminoglucósidos) (Ardoino *et al.*, 2006). Las perras infectadas, clínicamente normales pueden transmitir la infección a su descendencia. Además a pesar de la terapéutica, los machos intactos pueden presentar infertilidad irreversible, lo cual determina que su propósito de crianza sea malo (Badaksh *et al.*, 1982). Estudios restringidos han demostrado que la infección de la próstata parece irreversible, por lo que no puede eliminarse en la mayoría de los casos.

El tratamiento efectivo considera la eliminación de *B. canis* del cuerpo, lo cual es una dificultad reconocida en todas las especies del género *Brucella*. Los regímenes con tetraciclina sola no son efectivos debido a que es un bacteriostático y no bactericida, aún administradas en dosis altas. Sin embargo dosis altas de tetraciclinas junto con estreptomicina logran una mejora clínica y remisión de la bacteriemia (Maurin y Raoult, 2001).

Las recomendaciones actuales para el tratamiento de perros esterilizados consisten en el uso de Doxyciclina (5 a 10 mg/kg) por 4 a 8 semanas junto con estreptomicina (5 a 10 mg/kg) durante la primera a cuarta semana. Además, cultivos de sangre o monitoreo serológico repetido son requeridos como mínimo por 6 meses posteriores a la antibioticoterapia (Scheftel, 2003).

## **2.18. PRONOSTICO**

Se considera grave (Fredrickson y Barton, 1974), debido a los problemas que ocasiona en el tracto reproductor, es decir, esterilidad en los machos (por la atrofia testicular), así como fallas para concebir en las perras, sin embargo, canes infectados por *B. canis*, sobreviven por un período prolongado lo que hace que esta enfermedad sea de curso crónico (Nelson y Couto, 1995).

## 2.19. PREVENCIÓN Y CONTROL

Las estrategias de prevención y control de la brucelosis canina, tanto en poblaciones humanas como animales, requieren del monitoreo serológico de aquellos grupos específicos con mayor riesgo de contraer la enfermedad, aislamiento y eliminación de animales infectados y utilización de procedimientos higiénicos y de desinfección (Laing, 1991). En poblaciones canina, la prevención requiere de pruebas serológicas anuales para los reproductores y el control serológico de aquellos perros que ingresan a un criadero (Shin y Carmichael, 1999).

Únicamente aquellos animales con diagnóstico negativo a *B. canis* deben destinarse a reproductores. Por ello es importante determinar que los reproductores sean negativos. Interesantemente, se ha sugerido que el diagnóstico serológico es más adecuado durante la fase del estro en perras, ya que la bacteriemia es elevada bajo influencia hormonal (Nelson y Couto, 1995). Así mismo, la inseminación artificial (IA) se ha convertido en una medida que podría prevenir la transmisión de la enfermedad. Sin bien la IA no evitaría la presencia de la bacteria en semen, si evitaría la transmisión de perras infectadas hacia machos sanos (Foster, 2003).

La cuarentena, el monitoreo y la eutanasia de perros infectados son métodos de necesidad primaria para eliminar y prevenir la dispersión de la brucelosis canina en centros de cría (Hollett, 2006). El período de cuarentena para animales que ingresan por primera vez a un centro de cría debe ser como mínimo de 30 días (Rhoades y Mesfin, 1980), y los animales son liberados de cuarentena si presentan dos resultados seronegativos en dicho período. Si un criadero es reportado como contaminado, todos los animales (incluso los animales negativos) y personal deben ser monitoreados serológicamente. El monitoreo debe realizarse por los próximos 2 a 3 meses siguientes a la notificación. Las pruebas deberán continuarse cada mes hasta que un mínimo de 3 pruebas consecutivas no identifiquen a ningún animal positivo a *B. canis* (Kirk, 1997; Nelson y Couto, 1995). Los animales positivos deben ser aislados y evaluados hasta poder ser trasladados de las instalaciones o sacrificados (Hollett, 2006). La castración en perros machos y esterilización en hembras es una medida que ayuda a disminuir la transmisión de la enfermedad en criaderos o albergues de mascotas. Durante los procesos de cuarentena y monitoreo de los animales, solo el personal autorizado debe ingresar a las instalaciones. Es importante además evitar el contacto de personas inmunosuprimidas, niños o mujeres en gestación con los animales durante la cuarentena (Hollet, 2006).

Los fetos abortados o tejidos contaminantes como placenta y secreciones deben ser removidos inmediatamente mediante la utilización de ropa adecuada y de guantes descartables. *B. canis* no sobrevive por mucho tiempo fuera del hospedador. Por lo tanto pueden ser destruidas por calentamiento a 60°C por 10 minutos o por exposición a fenol 1% por 15 minutos (Wilson, 1983). Algunos desinfectantes utilizados para la desinfección incluyen amonio cuaternario, hipoclorito de sodio al 1%, etanol al 70% y formaldehído (Hollett, 2006).

Intentos realizados para el desarrollo de una vacuna conveniente que pueda inducir inmunidad, sin provocar respuesta serológica que interfiera con el diagnóstico serológico no ha sido exitoso aún. Actualmente las vacunas diseñadas contra brucelas solo han conferido protección moderada y los perros vacunados desarrollan anticuerpos que se confundirían con el diagnóstico (Shin y Carmichael, 1999).

## **2.20. IMPLICANCIA EN SALUD PÚBLICA**

La brucelosis canina es una enfermedad zoonótica, considerada por la OMS dentro del grupo de enfermedades infecciosas de tipo ocupacional o profesional. Asimismo, es considerada en la lista B de enfermedades de la Oficina Internacional de Epizootias (Cotrino *et al.*, 2002).

La epidemiología referente a infecciones con *B. canis* en humanos está pobremente descrita. Si bien la brucelosis canina es considerada una enfermedad de notificación inmediata, son pocos los casos de brucelosis que son diagnosticados como agente etiológico a *B. canis* (Kazmierczak, 2012). La transmisión de *B. canis* hacia los seres humanos requiere el contacto cercano con animales con infección activa, o con cultivos bacterianos, por ello su importancia como enfermedad ocupacional (Wallach *et al.*, 2004).



Es importante mencionar que el ser humano puede resultar infectado con una variante menos virulenta de *B. canis* (M-) la cual es utilizada como antígeno para ensayos serológicos (CDC, 2011). Sin embargo, dichas infecciones raramente son sintomáticas en humanos, lo cual se podría deber a la baja virulencia de la cepa (Madkour, 2001).

La gran mayoría de información referente a brucelosis humana ocasionada por *B. canis* consiste en reportes de casos individuales o casos humanos en grupos específicos. Por ejemplo, la enfermedad ha sido reportada en personas que tienen contacto cercano con perros infectados y personal de laboratorio (Wallach *et al.*, 2004; Lucero *et al.*, 2010;). Sin embargo, la poca data serológica de humanos con la que se cuenta es contradictoria, debido principalmente a las diferentes pruebas diagnósticas utilizadas. Uno de los estudios más controversiales fue realizado mediante la prueba de aglutinación en placa en 1975, en el cual se realizó la encuesta serológica en 4 grupos poblacionales: recién nacidos (n=139), adultos de población general (n=2026), veterinarios (n=73) y pacientes con historia clínica de fiebre de origen desconocido (n=113). Los resultados de seroprevalencia en los cuatro grupos fueron 5.7%, 67.8%, 72.6% y 80.5% respectivamente (Monroe *et al.*, 1975).

En los humanos, la brucelosis puede llegar a ser una enfermedad seria, debilitante y crónica, la cual puede afectar una variedad de órganos. Infecciones con *B. canis* en humanos ocasionan fiebre recurrente, hepatitis granulomatosa, esplenomegalia, adenopatía submaxilar (Rousseau, 1985; Schoenemann *et al.*, 1986).

### **III. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1. METODOLOGIA DEL ESTUDIO**

La metodología del presente trabajo corresponde a un estudio de tipo transversal. Los estudios transversales se caracterizan en la obtención de “n” individuos de una población conocida y el posterior análisis sobre la presencia de un determinado evento de interés (Thursfield, 1990). El presente trabajo evaluó la prevalencia de caninos seroreactores positivos a *Brucella canis* en el distrito de Los Olivos.

#### **3.2. LUGAR Y PERIODO DE ESTUDIO**

Como ha sido mencionado anteriormente, el estudio se realizó durante los meses de Julio a Diciembre del 2012, en el distrito de Los Olivos. Para la realización del trabajo se contó con la participación del municipio distrital, clínicas veterinarias así como las campañas de salud y empadronamiento canino. La distribución espacial del muestreo de caninos abarcó los sectores Norte, Sur, Este y Oeste del distrito (**ANEXO 1**).

### 3.3. DESCRIPCIÓN DEL MATERIAL EXPERIMENTAL

#### a) Tamaño muestral

La determinación del tamaño muestral mínimo requerido para el estudio se realizó mediante la fórmula para estimación de una proporción (Ahlbom y Norell, 1990). Debido a que inicialmente no se contó con información referente a la población canina en el área de estudio, se realizó el ajuste de la fórmula de estimación para poblaciones infinitas mediante la siguiente fórmula:

$$n = \frac{z^2 pq}{d^2}$$

Donde:

n= número mínimo de animales requeridos para el estudio

z= 1.96 (valor de z para un nivel de confianza de 95%)

p= prevalencia referencial

q= 1-p

d= estimador de error máximo permitido (5%)

Resultando:

<b>n = 288</b>
----------------

EL valor de prevalencia referencial utilizado para la estimación muestral fue obtenido a partir de los resultados de un estudio de brucelosis canina realizado previamente en la ciudad de Lima ( $p= 0.15$ ; Ramírez, 2006). A partir de los datos, el número mínimo requerido para realizar el estudio fue 196 animales. Sin embargo, debido a la disponibilidad de recursos y de unidades experimentales, se incrementó el tamaño muestral hasta un número de 288 caninos. Se determinó como criterio de exclusión a aquellos animales que presentaran manifestación clínica de enfermedad. La distribución final del número de caninos a muestrear se realizó en relación a los cuadrantes Norte, Sur, Este y Oeste del distrito (**Anexo 2**).

## b) Toma de muestra

Las tomas de muestras de caninos para el estudio fueron realizadas durante consulta general en centros veterinarios del distrito (considerando únicamente aquellos animales que llegan por vacunación, desparasitaciones, etc., más no aquellos animales clínicamente enfermos). Además se consideró el muestreo durante campañas de salud canina realizadas en parques (**Figura 5**), así como campañas de empadronamiento canino, en donde el muestreo fue realizado casa por casa (**Figura 6**).

**Figura 5. Campañas de Salud y empadronamiento en parque del Distrito de Los Olivos**



**Figura 6. Toma de muestras a caninos del Distrito de Los Olivos**



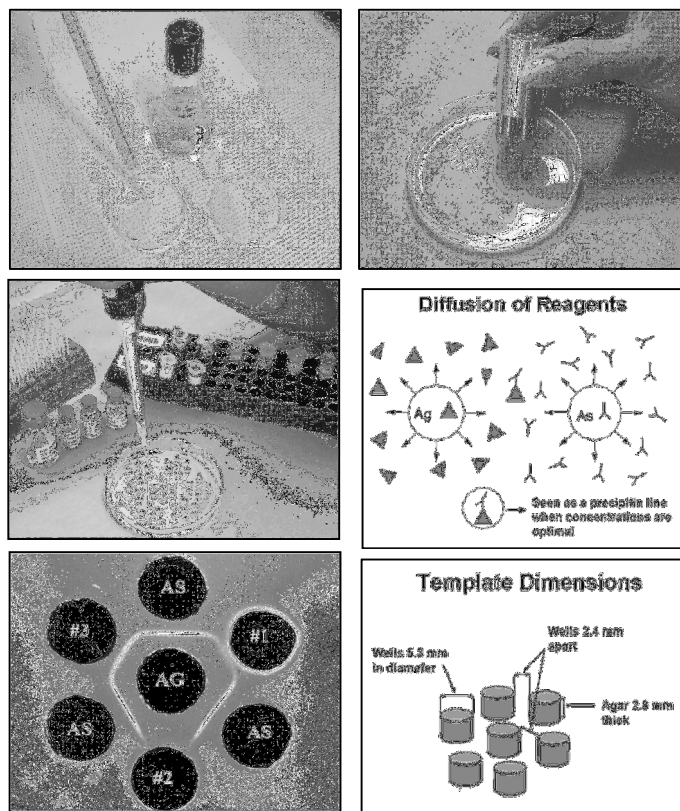
Se obtuvieron muestras de sangre mediante punción de la vena cefálica, para lo cual se utilizó el sistema de sangrado al vacío (Vacutainer sin anticoagulante). Se recolectó un volumen promedio de 3 ml por cada animal. Los tubos fueron rotulados con el ID de identificación asignado a cada uno de los animales, fueron colocados en gradillas, almacenados inmediatamente en refrigeración y trasladados inmediatamente al Laboratorio de Parasitología y Microbiología de La Facultad de Medicina Veterinaria – UNMSM para ser procesadas.

Posteriormente, los tubos con muestras de sangre fueron procesados mediante centrifugación a 3000 Revoluciones por minuto (RPM) por 10 minutos. Finalmente se alicuota 1 a 2 ml de suero, y transferidos a viales herméticamente protegidos. Los viales fueron rotulados y almacenados en congelación hasta que fue realizado el procesamiento diagnóstico.

### **c) Procesamiento de las muestras – Prueba Diagnostica**

El diagnóstico de caninos seroreactores a *Brucella canis* se realizó mediante la prueba de Inmunodifusión en gel agar (IDGA). Esta prueba se basa en una reacción de precipitación en fase líquida, entre un antígeno y anticuerpos, en donde se lleva a visualizar bandas de precipitación (**Imagen 7**). Para el desarrollo de nuestro estudio, utilizamos antígeno de *B. canis*, la cual presenta el componente lipopolísacarido de tipo rugoso, es específico para las especies de brucelas denominadas rugosas y no presenta reacción cruzada con otras especies de brucelas (Veliz et al., 1974).

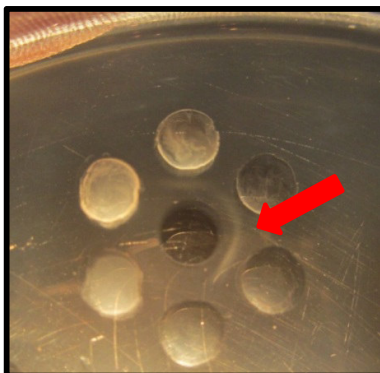
## Imagen 7. Técnica de Inmunodifusión en Agar Gel



Descripción general de la prueba de Inmunodifusión en agar gel (IDAG). Las imágenes superiores indican la metodología de laboratorio, mientras que las imágenes inferiores indican el principio de reacción inmunológica y el resultado diagnóstico. (Imágenes tomadas de Dennis A. Senne – National Veterinary Services Laboratory USA).

Debido que el diagnóstico de la prueba es principalmente cualitativo, la interpretación de la prueba, en función de la identificación del halo de precipitación entre antígeno y anticuerpos, requiere de personal altamente capacitado. Los resultados de la prueba de IDAG fueron denominados como positivos, si se evidencia el halo de precipitación dentro de 24 a 48 horas, y negativos, si no se observó reacción alguna (**Imagen 8**)

**Imagen 8. Resultados positivos (flecha roja)**



#### **d) Obtención de la información**

Posterior a la toma de muestra de sangre, se procedió a realizar una pequeña encuesta a los propietarios, con la finalidad de obtener información referente a la edad, sexo, condición fisiológica de las mascotas así como otras variables de interés para el análisis (**Anexo 3**). La información obtenida en las encuestas fue trasladada a una hoja de cálculo de Excel mediante codificación de las variables de estudio (sexo “0:hembras 1:macho”; edad “0: menores de 1 año 1:mayores de 1 año”; condición fisiológica “0:no esterilizado 1:esterilizado”; hábitos de paseo “0:no sale a la calle 1:sí sale a la calle”; cruces con otro perro “0”no se ha cruzado” 1”si se ha cruzado”). Adicionalmente, se obtuvo información sobre la historia de abortos y/o nacimiento de crías muertas en la población de caninos hembra muestreados.

#### **e) Análisis estadístico**

La información obtenida fue organizada y procesada en el paquete estadístico *Stata versión 12.0* (Stata Corp, TX). Los resultados de seroprevalencia de brucelosis canina fueron corregidos en función de los valores de sensibilidad y especificidad de la prueba diagnóstica, de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$P_c = \frac{p + \beta - 1}{\alpha + \beta - 1}$$

Donde: f)

$p_c$ = Prevalencia corregida

$p$ = prevalencia

$\beta$ = especificidad de la prueba (100%)

$\alpha$ = sensibilidad de la prueba (91.7%) (Nuñez-Torres *et al.*, 1998).

Los resultados de seroprevalencia (seroreactores positivos) y seroprevalencia corregida con sus respectivos intervalos de confianza fueron presentados para cada una de las variables consideradas en el estudio.

Se realizó el análisis de regresión logística multinomial (Hosmer y Lemeshow, 2002) para evaluar de forma conjunta el efecto de las variables de asociación sobre la variable dependiente (seroreactores a brucelosis). Se consideraron las siguientes variables para el análisis:

- $y$  = Diagnóstico de brucelosis (variable dependiente)
- $x_1$  = Edad (variable dicotómica: <1 año y 1 o más años)
- $x_2$  = Sexo (variable dicotómica: hembra y macho)
- $x_3$  = Condición fisiológica (variable dicotómica: Entero o esterilizado)
- $x_4$  = Sale a pasear a la calle (variable dicotómica: Si o no)
- $x_5$  = Historia de cruce con otros perros (variable dicotómica: Si o no)

La ecuación de regresión logística quedó definida por la siguiente expresión:

$$g(x) = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_3 x_3 + \beta_4 x_4 + \beta_5 x_5$$

Donde  $g(x)$  representa el logit ( $\log(\pi(x)/1-\pi(x))$ ) para la variable respuesta o “ $y$ ” (diagnóstico de brucelosis),  $\beta_0$  al intercepto y  $\beta_1, \beta_2, \beta_3, \beta_4$  y  $\beta_5$  representan los valores de coeficiente de regresión para cada una de las variables anteriormente mencionadas. Los



resultados del análisis de regresión fueron presentados como Odds ratio (razón de chances;  $e^{\beta_k}$ ) para cada una de las variables de asociación. Los resultados fueron presentados con sus respectivos intervalos de confianza al 95% y se determinó la significancia estadística de las variables si el valor de p ( $p_{\text{value}}$ ) fue menor a 0.05.

## IV. RESULTADOS

### 4. 1. RESULTADOS DE SEROPREVALENCIA

El presente estudio serológico fue realizado en 288 caninos del distrito de los Olivos. Los resultados de la prueba serológica de IDAG indicaron una prevalencia de  $4.86 \% \pm 1.83\%$  (IC 95%). En función de los resultados de sensibilidad y especificidad de la prueba diagnóstica de IDAG (91.7% y 100% respectivamente), la prevalencia corregida de seroreactores a *B. canis* fue estimada en un  $5.30\% \pm 2.59\%$  (IC 95%).

La distribución de los resultados de acuerdo a las variables incluidas en el estudio es presentada en el **Cuadro 11**. En relación al sexo los resultados de seroprevalencia y seroprevalencia corregida fueron ligeramente superiores en hembras que en machos, mientras que en relación a la edad, la mayor proporción de seroreactores a *B. canis* se encontró en los animales de 4 a 8 años de edad (8.06% y 8.79%).

En relación a la condición fisiológica de los animales muestreados, los resultados de seropositividad resultaron ligeramente mayores en los animales enteros (5.06%) que en los animales esterilizados (3.23%), mientras que la proporción de caninos seropositivos que

pasean y no pasean fuera de casa fueron muy similares. Por otro lado, los resultados indicaron una mayor proporción de seroreactores positivos en los animales que no presentaron historia de haberse cruzado con otros caninos (8.23%), a diferencia de los caninos que si tienen historial de cruces (1.49%).

**CUADRO 11. Resultados de prevalencia corregida a seroreactores contra *Brucella canis* en el distrito de Los Olivos mediante prueba de Inmunodifusión en Agar gel, y distribución de resultados de acuerdo a las variables incluidas en el estudio**

VARIABLE	SEROPOSITIVOS / TOTAL	SEROPREVALENCIA ± IC95%	SEROPREVALENCIA CORREGIDA ± IC95%
<b>Sexo</b>			
Hembra	7/131	5,34 ± 3,85	5,82 ± 4,01
Macho	7/157	4,46 ± 3,23	4,86 ± 3,36
<b>Edad</b>			
<1 año	2/87	2,30 ± 3,75	2,51 ± 3,29
1 – 4 años	7/118	5,93 ± 3,72	6,47 ± 4,44
4 – 8 años	5/62	8,06 ± 6,37	8,79 ± 7,05
8 – 15 años	0/21	-	-
<b>Condición fisiológica</b>			
No esterilizado(a)	13/257	5,06 ± 2,01	5,52 ± 2,79
Esterilizado(a)	1/31	3,23 ± 6,22	3,52 ± 6,49
<b>Sale a pasear</b>			
Si	12/246	4,88 ± 2,69	5,32 ± 2,81
No	2/42	4,76 ± 7,57	5,19 ± 6,71
<b>Se ha cruzado con otro perro(a)</b>			
Si	1/67	1,49 ± 4,10	1,62 ± 3,02
No	13/158	8,23 ± 3,21	8,97 ± 4,46
<b>TOTAL</b>	<b>14/288</b>	<b>4,86 ± 1,83</b>	<b>5,30 ± 2,59</b>

#### 4. 2. REGRESION LOGISTICA MULTINOMIAL

Los resultados del análisis de regresión logística multinomial son presentados en el **Cuadro 12**. Como podemos apreciar ninguna de las variables presentó factor de riesgo (OR>1) estadísticamente significativo en el presente estudio ( $p>0.05$ ).

**CUADRO 12. Resultados del modelo de regresión logística multinomial para la evaluación del efecto de todas las variables sobre los resultados de serología a *B. canis***

Variable	Odds Ratio	Error estándar	Z	Prob > z	IC (95%)
<b>Edad</b>					
<1 año (ref.)					
1 a más años	3.273	2.585	1.50	0.133	0.696 - 15.388
<b>Sexo</b>					
Hembra (ref.)					
Macho	0.949	0.545	-0.09	0.927	0.308 - 2.923
<b>Condición fisiológica</b>					
Entero(a) (ref.)					
Esterilizado(a)	0.571	0.629	-0.51	0.611	0.066 - 4.941
<b>Sale a pasear</b>					
No (ref.)					
Si	0.847	0.686	-0.20	0.838	0.173 - 4.145
<b>Historia de cruce</b>					
No (ref.)					
Si	0.146	0.154	-1.82	0.068	0.018 - 1.156

#### 4.3. RESULTADOS EN LA POBLACIÓN DE CANINOS HEMBRA

En el presente estudios, se recolectaron muestras de suero de 131 caninos hembra. A partir de la población de hembras se obtuvo la proporción de seroreactores a *B. canis* de acuerdo a la historia de abortos, y la historia de partos con crías muertas. Los resultados de seroprevalencia y seroprevalencia corregida con sus respectivos intervalos de confianza al 95% son presentados a continuación (**Cuadro 13**)

**CUADRO 13. Resultados de prevalencia corregida a seroreactores contra *Brucella canis* en el distrito de Los Olivos mediante prueba de Inmunodifusión en Agar gel en la población de caninos hembra mayores de 1 año**

VARIABLE	SEROPOSITIVOS / TOTAL	SEROPREVALENCIA A $\pm$ IC95%	SEROPREVALENCIA CORREGIDA $\pm$ IC95%
<b>Historia de abortos</b>			
Si	0/1	-	-
No	7/91	7,69 $\pm$ 5,47	8,39 $\pm$ 5,70
<b>Crías muertas</b>			
Si	0/6	-	-
No	7/93	7,53 $\pm$ 5,36	8,21 $\pm$ 5,58
<b>TOTAL</b>	<b>7/99</b>	<b>7,07 <math>\pm</math> 5,05</b>	<b>7,71 <math>\pm</math> 5,25</b>

Los resultados del **Cuadro 13** Indicaron la ausencia de seroreactores en la población de caninos hembra con historia de abortos, así como con historia de partos con crías muertas.

## V. DISCUSIÓN

La brucelosis canina ocasionada por *B. canis* es una enfermedad infecciosa en las poblaciones caninas y presenta un carácter zoonótico, de importancia en Salud Pública. El objetivo del presente estudio fue determinar los niveles de prevalencia de caninos seroreactores a *B. canis* en el distrito de Los Olivos, mediante la prueba serológica de IDAG. Además se evaluaron factores asociados a la presentación de seropositividad a *B. canis* en la población canina.

Los resultados obtenidos a partir del presente estudio, con un total de 288 caninos muestreados, nos indicó un nivel de seroprevalencia corregida de 5.30% ( $\pm$  2.59). Los resultados obtenidos fueron menores a los ya reportados en un estudio previo, en el cual mediante la técnica de aglutinación en Mercaptoetanol se encontró un 28% de perros positivos en Lima Metropolitana (Reyes, 1977). A pesar de ello, los resultados indican que la exposición a *B. canis* ocurre en la población canina de Los Olivos (evidenciado por la presencia de anticuerpos).

En nuestro estudio, se realizó un muestreo aleatorio de la población canina general. Por otro lado, Reyes (1997) obtuvo las muestras a partir de grupos específicos de caninos (albergues y/o criaderos los cuales son considerados grupos de riesgo). Otro punto importante radica en el uso del método diagnóstico en ambos estudios. Nuestro estudio se basó en el uso

de la técnica diagnóstica de IDAG. Esta técnica forma parte de los métodos de precipitación, los cuales son caracterizados por moderados niveles de sensibilidad, pero altos niveles de especificidad (Sensibilidad: 91.7%; Especificidad: 100%) (Tizard, 1998). Por otro lado, las pruebas de aglutinación, como la técnica de aglutinación con Mercaptoetanol utilizado por Reyes, es usualmente descrita como una prueba de screening (Sensibilidad: 95.9%; Especificidad: 96.7%). Esto nos indica que probablemente muchos de los animales evaluados pudieron haber sido falsos positivos.

Un estudio similar de brucelosis canina fue realizado en dos distritos de la Provincia Constitucional del Callao (Ramírez, 2006). Los resultados indicaron una seroprevalencia del 15.57%, a partir de muestras de suero canino procedente de clínicas veterinarias, campañas caninas y de empadronamiento. Aparentemente la transmisión de *B. canis* en nuestro estudio ocurre con menor intensidad en la población canina general.

La ocurrencia de brucelosis canina ha estado asociada a poblaciones caninas específicas (Moreno *et al.*, 2003). Además es considerada una enfermedad ocasional en humanos de tipo ocupacional. Los diferentes estudios llevados a cabo han demostrado brotes de la enfermedad en criaderos de perros, en donde la historia de abortos ha sido caracterizada como una variable predictora de la enfermedad. Sin embargo los resultados obtenidos en la población de caninos hembras mayores de 1 año (edad reproductiva promedio) no indicaron mayor proporción de seroreactores a *B. canis*. Esto se podría deber a la falta de representatividad de los datos. A diferencia de los caninos que son mascotas domésticas, los caninos que son mantenidos en criaderos se encuentran en contacto permanente con otros caninos, razón por la cual se incrementa el riesgo de transmisión mediante secreciones vaginales, semen y tejidos contaminantes de animales infectados.

Los resultados indicaron que no existe predisposición por sexo para la infección con *B. canis*, lo cual concuerda con lo descrito por Carmichael (1999). Estos resultados además concuerdan con estudios realizados anteriormente en poblaciones caninas (Megid *et al.*, 1999; Cotrino *et al.*, 2003). Sin embargo, es importante considerar que la infección en caninos machos resulta más difícil de tratar, por lo que muchos de estos animales pueden convertirse en focos de transmisión de la enfermedad, principalmente por el arresto de la bacteria en la próstata (Boeri *et al.*, 2008).

En relación a la edad, los animales de 4 a 8 años presentaron mayores niveles de seroprevalencia a *B. canis*. Si bien los animales pueden infectarse a cualquier edad de su vida, existe mayor predisposición de infección en animales en edad reproductiva. No obstante los resultados no demostraron asociación entre la edad y la seropositividad a *B. canis*, lo cual concuerda con resultados de encuestas serológicas realizados anteriormente (Megid *et al.*, 1999; Cotrino *et al.*, 2003).

La condición fisiológica indicó una proporción ligeramente mayor de seroreactores a brucelosis canina en perros enteros que en perros esterilizados o castrados. Sin embargo, los resultados del análisis de regresión no fueron significativos para dicha variable ( $p>0.05$ ). Una posible explicación puede ser debido a la desigual distribución de poblaciones de animales enteros ( $n=257$ ) y esterilizados ( $n=31$ ), a partir del cual se pueden obtener resultados sin representatividad en la población. Además es probable un animal se infecte antes de ser esterilizado y/o castrado, por lo cual los anticuerpos podrían persistir tiempo después, siendo considerados algunos como falsos positivos.

Los resultados de seropositividad a *B. canis* no demostraron diferencias entre los perros que salen a la calle o no salen ( $p>0.05$ ). Como se ha mencionado antes, la infección es más probable en criaderos de perros o en albergues, en donde la transmisión sexual o el contacto con tejidos y/o secreciones contaminadas son las rutas de infección (Carmichael, 1998).

La proporción de seropositivos resultó mayor en aquellos animales que no reportaron historial reproductivo (8.97%) comparados a los animales con historial reproductivo (1.62%). Estos resultados contradicen lo observado por Ramírez (2006), quien demostró mayor cantidad de seropositivos en los animales con historial reproductivo. Posibles explicaciones para estos resultados vendrían del hecho que realmente muchos dueños no brindaron una información real sobre el historial reproductivos de sus mascotas. Es probable que muchos animales en el área de estudio hayan reportado actividad reproductiva y los dueños no la han notificado. Ya que la actividad reproductiva es un aspecto importante en la ruta de transmisión (Boeri *et al.*, 2008), esta información debe ser considerada con cautela.



Los resultados del estudio nos han demostrado que si bien la prevalencia de seroreactores a brucelosis canina en el distrito de Los Olivos es baja, está presente, por lo cual el ciclo de transmisión está ocurriendo.

## VI. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

- La seroprevalencia de brucelosis canina en el distrito de Los Olivos fue de  $4,86 \pm 1,83\%$  y la prevalencia corregida fue de  $5,30 \pm 2,59\%$ .
- Los resultados del análisis de regresión logística no demostraron un efecto estadísticamente significativo para las variables de evaluación incluidas en el estudio sobre los resultados de seroprevalencia de brucelosis canina
- La brucelosis canina está presente en el distrito de Los Olivos. Por lo tanto, se recomienda el monitoreo serológico en los criaderos de caninos destinados a mascotas, así como en albergues caninos ya que son lugares donde el riesgo de transmisión por *B. canis* es más alto.
- EL monitoreo serológico de brucelosis canina en grupos animales es una herramienta de vital importancia para el control de la enfermedad, principalmente en criaderos de mascotas, así como la vigilancia y cuarentena de animales nuevos en un criadero.
- La prueba de IDAG es una prueba de fácil procesamiento e interpretación, ofreciendo además la ventaja debido a ser de bajo costo. Por estas razones se podría utilizar en estudios similares para diagnosticar brucelosis canina en otras zonas de la ciudad de Lima o del Perú.
- El uso de la prueba de IDAG es una herramienta diagnóstica de fácil aplicación y relativamente económica para su implementación en el monitoreo de la brucelosis canina, debido a su importancia en Salud Pública.

- Se debería poner más énfasis en la educación sanitaria de la población con el fin de difundir, información sobre esta enfermedad y otras que puedan representar un riesgo de salud pública.

## CAPITULO VII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. **Acha P, Szyfres B. 2003.** Zoonosis y Enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales 3ra Edición, Vol: 1. Oficina Panamericana de la Salud. Publicación Científica y Técnica N° 580. Washington DC. 28-52p.
2. **Ahlborn A, Norrel S. 1990.** Introduction to model epidemiology. 2nd. Edition. USA. Research
3. **Almeida A, Santorelli A, Bruzadelli S. 2001.** Soroepidemiologia da brucelose canina causada por *Brucella canis* e *Brucella abortus* na cidade de Alfenas, Brazil. Arquivo Brasileiro Medicina Veterinaria e Zootecnia Brazil. 56(2): 65-70p.
4. **Anderson GI, Binnington AG. 1983.** Discospondylitis and orchitis associated to high titre in a dog. Can Vet J. 24: 249-252p.
5. **Angel MO, Ristow P, Ko AI, Di Lorenzo C. 2012.** Serological trail of *Brucella* infection in an urban slum Population in Brazil. J Infect Dev Ctries 6(9): 675-679p.
6. **Ariza J.1995.** Medicina Interna: Brucelosis. 13ra Edición. Barcelona. Mosby Doyma libros S.A. 312-317p.
7. **Ardoino SM, Baruta DA, Toso RE. 2006.**Brucelosis canina. Ciencia Veterinaria Vol 8 Nro 1. ISSN.1515-1883p.
8. **Aréstegui M, Gualtieri C, Dominguez J, Scharovsky G. 2001.** El género *Brucella* y su interacción con el sistema mononuclear fagocítico. Veterinaria México. Vol 32(2): 131-139p.
9. **Badaksh FF, Carlmichael LE, Douglas JA. 1982.** Improved rapid slide agglutination test for presumptive diagnosis of canine brucellosis. J Clin Microbiol. 15:286-289p.

10. **Borie C. 2002.** Descripción de las características reproductivas en tres perros seropositivos a *Brucella canis*. Archivos de Medicina Veterinaria-Facultad de Ciencias Veterinarias-Universidad Austral de Chile. Vol 34(1): 17-24p.
11. **Boeri E, Escobar GI, Ayala SM, Sosa-Estani S, Lucero NE. 2008.** Canine brucellosis in dogs in the city of Buenos Aires. Medicina (B. Aires) 68(4): 291-297p.
12. **Boschiroli MI, Ouahrani-Bettache S, Foulogne V.2002.** The *Brucella suis* VirB operon is induced intracelullarly in macrophages. Proct Natl Acad Sci USA . 1544-1549p.
13. **Bosu WT, Prescott JF. 1980.** A serological survey of dogs for *Brucella canis* in Southwestern Ontario. Can Vet J 21(7): 198-200p.
14. **Bower A, Okwumabua O, Massengil C, Muenks Q, Vanderloo P, Duster M. 2007.** Investigation of the spread of *Brucella canis* via The US interstade dog trade. Int J Infect Dis. 11(5): 454-458p.
15. **Briseño H, Páramo R, Flores R, Suárez F. 2004.** Problemas reproductivos en perros infectados com *Brucella canis*. Vet. Mex. 35(2): 121-128p.
16. **Brown J, Blue JL, Wooley RE, Dreesen DW. 1976.** *Brucella canis* infectivity rates in stray and pet dogs populations. Am J Public Health. 66:889-891p.
17. **Buchanan T, Sulzer C, Frix M, Feldman R. 1974.** Brucelosis in the United States 1960-1972. An abattoir-associate disease. Part II. Diagnostic Aspect Medicine. V. 36(6):15-25p.
18. **Carmichael LE. 1978.** Brucelosis (*Brucella canis*). In: Handbook series in Zoonoses. Steele H (Ed.). Sect A, V1.Boca Raton, Florida. CRC Press Inc. 185-194p.
19. **Carmichael LE. 1998.** Transmission of *Brucella canis* by contact exposure. Am J Vet Res.37 220-223p.
20. **Carmichael LE, Craig EG. 1993.** Enfermedades infecciosas en perros y gatos. Ed. McGraw-Hill Interamericana. 604-615p.
21. **Carmichael LE, George LW. 1975.** Canine brucellosis: New knowledge. International Symposium of Brucellosis (II) *Develop Biol Standdard* 31: 237-250p.
22. **Carmichael LE, Greene CE. 2000.** Canine Brucellosis. In: Infectious Diseases of the dog and cat. Greene CE (Ed.). Philadelphia. WB Saunders. 573-584p.
23. **Carmichael LE, Joubert J, Jones L. 1989.** Characterization of *Brucella canis* protein antigens and polypeptide antibody responses in infected dogs. Vet Microbiol. 19: 373-387p.
24. **Carmichael LE, Kenney RM. 1968.** Canine abortion caused by *Brucella canis*. Journal of American Veterinary Medical Association. V. 152(6): 605-616.

25. **Carmichael LE, Shin SJ. 1996.** Canine brucellosis: a diagnosticians dilemma. *Seminars in Veterinary Medicine and Surgery (Small Animal)*. V. 11(3): 161-165.
26. **Carter G. 1985.** *Bacteriología y Micología Veterinaria*. Editorial Manual Moderno, México. 231-236p
27. **Castro H, Gonzáles S, Prat M. 2005.** Brucelosis: Una revisiónpráctica. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*. Marzo- Junio. Buenos Aires.V. 30(2):203-216.
28. **[CDC] Center for Food Security and Public Health. 2011.** Canine Brucellosis:Brucellacanis.Availableat:[www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/brucellosis\\_canis.pdf](http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/brucellosis_canis.pdf)(Accessed November, 2012)
29. **Celi J. 2006.** Surviving inside a macrophage: The many ways of *Brucella*. *Res Microbiol* 157:93-98p
30. **Cloekaert A, Vizcaíno N, Paquet J, Bowden RA, Elzer PH. 2002.**Major outer membrane proteins of *Brucella spp.*: past, present and future. *Vet Microbiol* 90(1-4): 229-247p.
31. **Corrente M, Franchini D, Decaro N, Greco C, D'Abramo M, Greco MF, Latronico F, Crovace A, Martella V. 2010.** Detection of *Brucella canis* in a dog in Italy. *New Microbiol* 33(4): 337-341p
32. **Cottrino V, Castillo V, Moreno C. 2003.** Encuesta serológica sobre *Brucella canis* en pacientes atendidos en la clínica de pequeños animales en la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia de la Universidad Nacional de Colombia [Internet], [16 de febrero. 2013]. Disponible en: <http://lmvlt-da.com/programas/ar14.html>
33. **Crespo F. 1994.** *Brucelosis ovina y caprina*. Ed. Office International de Epizooties, Paris, Francia. ISBN 92-9044-342-1.
34. **Deyoe B. 1970.** Studies on the pathogenesis of a canine abortion agent *Brucella canis* in dogs and other domestic animals. Thesis. Cornell. State University, Ames, Iowa.
35. **DelVecchio V, Kapatral V, Redkar R, Patra G. 2001.** The genome sequence of the facultative intracellular pathogen *Brucella melitensis*.*Proceedings of the Academy of Sciences of the United States of America*. [Internet], [2 de marzo, 2013]. Disponible en: [www.cbs.dtu.dk/staff/dave/genomics\\_course/Brucella\\_melintensis.pdf](http://www.cbs.dtu.dk/staff/dave/genomics_course/Brucella_melintensis.pdf)
36. **Diaz R, Jones L, Wilson JB. 1968.** Antigen relationship of the gram negative organism causing canine abortion to smooth and rouge Brucellae. *J Bacteriology* 95: 618-624p.

37. **Díaz R, Toyos J, Salvo MD, Fernández-Lagos L, Alonso B, Moriyon I, Dorronsoro I. 1984.** Studies on the polysaccharide B an native haptene of *Brucella* and *Yersinia enterocolitica* serotipo 9. Dev. Biol. Stand. 56: 213-220p.
38. **Espíndola E. 2003.** Brucelosis canina: Revision y reporte de casos [Internet], [16 de febrero. 2013]. Disponible en: <http://lmvlttda.com/programas/ar18.html>
39. **Estein S. 1999.** Aspectos inmunológicos en el diagnóstico y control de la epididimitis contagiosa del carnero por *Brucella ovis*. Archivos Medicina Veterinaria. Universidad Austral de Chile. Vol 31(1): 5-13p.
40. **Ettinger S. 2002.** Tratado de Medicina Interna Veterinaria. 3ra Edición. Tomo III. Editorial Inter-Medica. California. 1931-1939p.
41. **[FAO] The Center for Food Security & Public Health. 2009.** Brucelosis en mamíferos marinos. Serie de Informes Técnicos. Agency of Canadá.
42. **Fitch TA. 2003.** Intracellular survival of *Brucella*: Defining the link with Persistence. Vet Microbiol 2516. 1-11p.
43. **Flores R, Carmichael LM. 1981.** Brucelosis causada por *Brucella canis*. Ciencia Médica. (3): 21p.
44. **Flores R, Segura R. 1975.** A serological and bacteriological survey of canine brucellosis in Mexico. Cornell Vet (66): 347-352p.
45. **Forbes LB, Tessaro SV. 1996.** Infection of cattle with *Brucella abortus* biovar 1 isolated from bison in Wood Buffalo National Park. Can. Vet. J. 37: 415-419.
46. **Foster R. 2003.** Brucellosis (*Brucella canis*) and abortions in dogs and puppies. Am J Vet Research USA. 22:306-307p.
47. **Foster G, Osterman S, Godfroid J, Jacques I, Cloeckert A. 2007.** *Brucella ceti* sp. Nov and *Brucella pinnipedialis* sp. Nov. for *Brucella* strains with cetaceans and seals as their preferred host. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology (57): 2688-2693p.
48. **Fredrickson LE, Barton CE. 1974.** A serologic survey for canine brucellosis in a metropolitan area. J Am Vet Med Assoc. 165(11): 987-990p.
49. **Galina C. 1988.** Reproducción de animales domésticos. Editorial Limusa. México. 212-213, 362-370p.
50. **George LW, Carlmichael LE. 1974.** A plate agglutination test for the rapid diagnosis of canine brucellosis. Am J Vet Res. 35:905-909p.

51. **Godoy A, Barg L, Peres N. 1976.** *Brucella canis* in Brasil. Proc. V. National Meeting on Microbiology. Brasil. 77 – 78p.
52. **Gonzales H, Ramírez R, Flores R, Suarez F. 2004.** Reproductive problems in male dogs infected with *Brucella canis*. [19de febrero. 2013]. Disponible en: [www.ejournal.unam.mx/vet\\_mex/vol35-02/RVM35204.pdf](http://www.ejournal.unam.mx/vet_mex/vol35-02/RVM35204.pdf)
53. **Gorvel JP, Moreno E. 2002.** Brucella intracellular life: from invasion to intracellular replication. Vet Microbiol 90: 281-297p.
54. **Gyuranecz M, Szeredi L, Rónai Z, Dénes B, Dencsó L, Dán A, Pálmai N, Hauser Z, Lami E, Makrai L, Erdélyi K, Jánosi S. 2011.** Detection of *Brucella canis* induced reproductive diseases in a kennel. J Vet Diagn Invest (23):143-147p.
55. **Henderson R, Hoerling B, Kramer T. 1974.** Discospondylitis in three dogs infected with *Brucella canis*. J Am Vet Med Assoc. 165: 451 – 455p.
56. **Higgins R, Hoquet F, Bourque R, Gosselin Y. 1979.** A serological survey of *Brucella canis* in the Province of Quebec. Can Vet J. 20(11): 315-317p.
57. **Hofer E, Bag GN, Revilla-Fernandez S, Melzer F, Tomaso H, Pez Go I, Fasching G, Schmoll F. 2012.** First detection of *Brucella canis* infections in a breeding kennel in Austria. New Microbiol 35(4): 507-510p.
58. **Hollett RB. 2006.** Canine Brucellosis: Outbreaks and compliance. Theriogenology (6): 575-587.
59. **Hosmer DW, Lemeshow S. 2000.** Applied Logistic Regression. Second Edition. John Wiley & Sons, Inc. Canada. 31-38p.
60. **Jeannings PB, Crumrine MH, Lewis GE, Fariss BL. 1974.** The effect of a two stage antibiotic regimen on dogs infected with *Brucella canis*. J Am Vet Med Assoc 164: 513-517p
61. **Joklik W, Willet P, Amos B, Wilfert C. 1997.** Microbiología 20a Edición. Médica Panamericana (Eds). Montevideo, Uruguay. 354-359p.
62. **Jones ML, Brinley WJ. 1958.** Informe preliminar sobre un medio selectivo para el cultivo de brucelas, inclusive de tipo aberrante. Bulletin of the World Health Organization. V.19 (1): 361-364p.
63. **Jubb K, Kennedy P, Palmer N. 1991.** Patología de los animales domésticos. 3ª ed. Edit. Agropecuaria Hemisferio sur, Uruguay. p 147;437.
64. **Jumas-Bilak, E., Michaux-Charachon, S., Bourg, G., O'Callaghan, D., Ramuz, M. 1998.** Differences in chromosome number and genome rearrangements in the genus *Brucella*. Mol. Microbiol. 3:99-106p.



65. **Kazmierczak J. 2012.** Health Implications of *Brucella canis* infections in Humans. Summary Findings and recommendations of the *Brucella canis* Workgroup. National Association of State Public Health Veterinarians.
66. **Keid LB, Soares RM, Vascocellos SA, Cheibao DP, Salgado VR, Megid J, Ritchzenhain LJ. 2007a.** A Polymerase chain reaction for detection of *Brucella canis* in vaginal swabs of naturally infected bitches. *Theriogenology*. 68(9): 1260-1270p.
67. **Keid LB, Soares RM, Vasconcellos SA, Chiebao DP, Megid J, Salgado VR, Ritchzenhain LJ. 2007b.** A Polymerase chain reaction for the detection of *Brucella canis* in semen of naturally infected dogs. *Theriogenology*. 67: 1203-1210p.
68. **Kirk R. 1997.** *Terapéutica veterinaria de pequeños animales XII*. Editorial McGraw Hill Interamericana, Mexico. 1177-1181p
69. **Krieg N. 1984.** *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Williams & Wilkins (Eds). Londres. Vol 1: 377-388p.
70. **Laing J. 1991.** *Fertilidad e infertilidad en la práctica veterinaria*. Editorial Interamericana McGraw Hill. España. 201-234, 283-284p
71. **Ledbetter EC, Landry MP, Stokol T. 2009.** *B. canis* edophtalmitis in three dogs: clinical features, diagnosis and treatment. *Vet Ophtalmol*12: 183-191p.
72. **Lopez V, Ruiz J, Giraldo C, Chilca C. 2007.** Seroprevalencia de *Brucella canis* en perros callejeros del Centro de Bienestar Animal "La Perla", Medellín (Colombia). *Rev. Colomb Cienc Pecu* 2007; 23:166-172.
73. **Lucero NE. 2000.** Sensitivity and specificity of an indirect enzyme-linked immunoassay for the diagnosis of *Brucella canis* infection in dogs. *J Med Microbiol* (8): 656-660p
74. **Lucero NE, Escobar GI, Ayala SM, Jacob N. 2005.** Diagnosis of human brucellosis caused by *Brucella canis*. *J Med Microbiol* 54(Pt 5): 457-461p.
75. **Lucero NE, Escobar GI, Ayala SM, López G. 2002.** Sensitivity and specificity of an indirect enzyme-linked immunoassay for the diagnosis of *Brucella canis* infection in dogs. *J Med Microbiol* 51(8): 656-660p.
76. **Lucero NE, Maldonado PI, Kaufman S. 2010.** *Brucella canis* causing infection in an HIV-Infected patient. *Vector Borne Zoo Dis*. 10(5): 537-529p.
77. **Madkour MM. 2001.** *Brucellosis: Overview*. In: Madkour MM (Ed.) *Brucellosis*. 2nd Edition. Berlin: Springer Verlag. 165-178p.

78. **Martin M, Casal J. 1994.** Comparison of serologic test used in canine brucellosis diagnosis. Reprinted from Journal of Veterinary Diagnostic Investigation 6 (2):257-259.
79. **Maurin M, Raoult D. 2001.** Use of aminoglycosides in treatment of infections due to intracellular bacteria. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 45 (11): 2977-2986p.
80. **Megid J, Mathias LA, Robles C. 2010.** Clinical manifestations of Brucellosis in domestic Animals and humans. The Open Veterinary Science Journal 4. 119-126p.
81. **Megid J, Britto A, Moraes C, Nava N, Agottani J. 1999.** Epidemiological assessment of canine brucellosis. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia Brasil. 51(5): 94-98p.
82. **Méndez G. 1998.** Seguimiento de un brote de *Brucella canis* en un criadero de la ciudad de México. XIX Congreso Nacional de la AMMVEPE. León
83. **Meyer M. 1960.** *Brucella* organisms isolated from dogs: Comparison of characteristics of members of the genus *Brucella*. Am. J. Vet. Res. 30: 1751-1756p.
84. **Michaux-Charachon S, Foulongne V, Bourg G, Cazevielle C, O'Callaghan D. 1997.** Genome structure and phylogeny in the genus *Brucella*. J. Bacteriol. 179(10):3244-3249p.
85. **Monroe PW, Silberg SL, Morgan PM, Adess M. 1975.** Seroepidemiological Investigation of *Brucella canis* antibodies in different human Population groups. J Clin Micro 2(5): 382-386p.
86. **Moore J, Gupta N. 1968.** Epizootiology, diagnosis and control of *Brucella canis*. J. Am. Vet. Med. Assoc. 156: 1737 – 1740.
87. **Morales D, Combariza D. 2004.** Seroprevalencia de brucelosis en trabajadores de mataderos de municipios del Tolima – Colombia. Rev. Cienc. Salud vol.2 no.1 Bogotá.
88. **Moreno E, Mayer H, Moriyón I. 1990.** Characterization of a native polysaccharide hapten from *Brucella melitensis*. Infect. Immun. 55, 2850 – 2853
89. **Morgan W. 1970.** Reviews of the progress of dairy science, section E. Diseases of dairy cattle brucellosis. J. Dairy Res 37: 303 – 360 p.
90. **Moriyón I, Moreno E, Cloeckart A. 2002.** *Brucella* evolution and taxonomy. Int. Microbiology Veterinary (90): 209-227.
91. **Myers DM, Jones LM, Varela-Diaz VM. 1972.** Studies of antigens for complement fixation and gel diffusion tests in the diagnosis of infections caused by *Brucella ovis* and other *Brucella*. Appl Microbiol. 23(5):894–902.
92. **Navarro E, Escribano J, Fernandez J, Solera J. 2002.** Comparison of three different PCR methods for detection of *Brucella spp* in human blood samples. FEMS Immunol Med Microbiol. 34(2): 147-151.

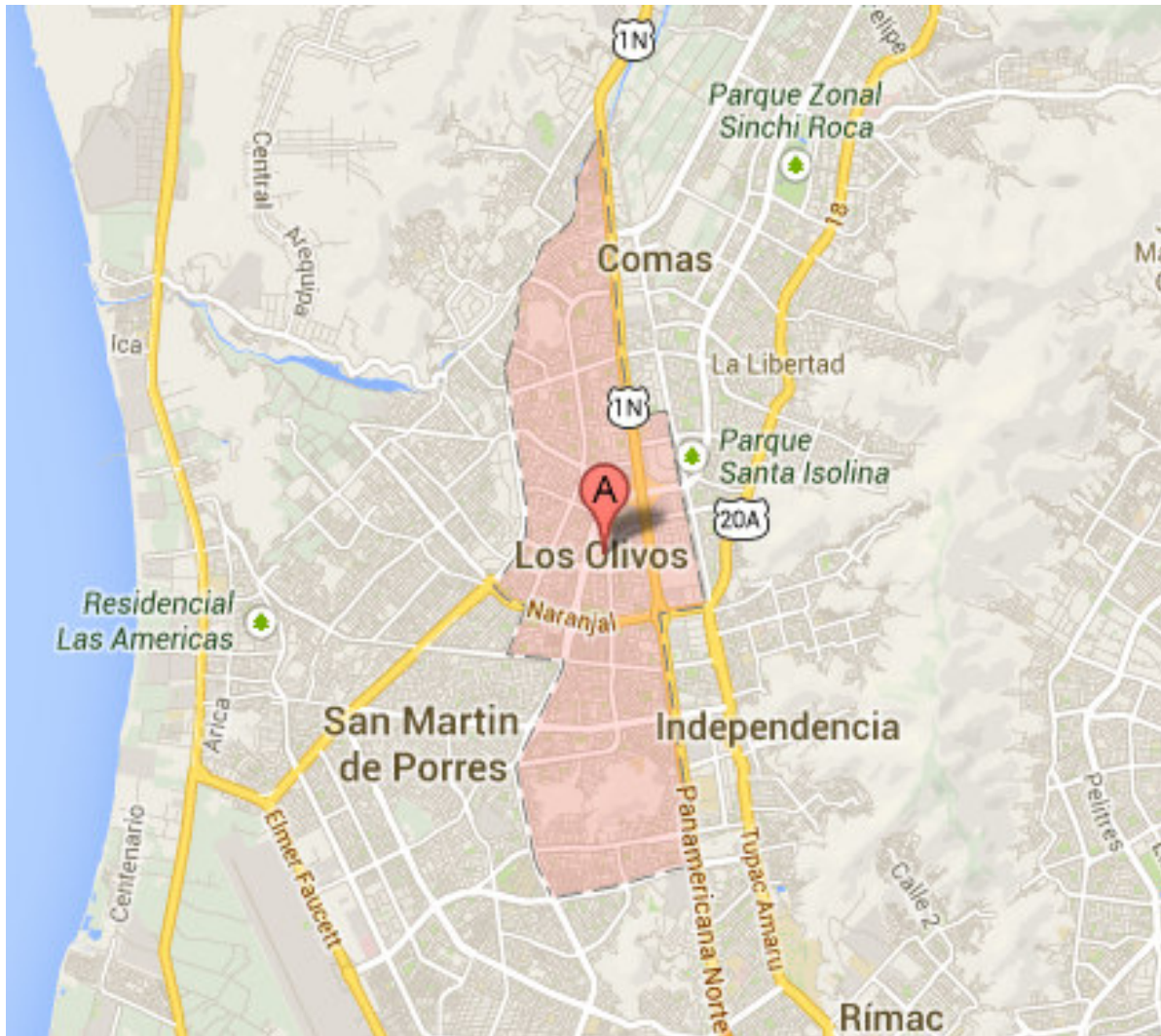
93. **Nelson R y Couto C. 1995.** Pilares de medicina interna en animales pequeños. Editorial Inter-Médica, Buenos Aires Argentina. 665-669p.
94. **Nuñez E. 1998.** Stability of antigen and agarose gel used in a double immunodiffusion serologic test for *Brucella ovis*. J Vet Diagn Invest 10: 113-115p.
95. **[OIE] Organización Mundial de Sanidad Animal. 2007.** Canine Brucellosis: *Brucella canis*. Contagious abortion, undulant fever, Center for Food security & Public Health in cooperation with the Institute for International Cooperation in Animal Biologics. OIE. 1-13p
96. **Orduña A, Almaraz A, Prado A, Gutiérrez MP, García-Pascual A, Dueñas A, Cuervo M, Abad R, Hernández B, Lorenzo B, Bratos MA, Rodríguez A. 2001.** Evaluation of an immunocapture-agglutination test (Brucellacapt) for the serodiagnosis of human brucellosis. J. Clin Microbiol. V. 38. 4000-4005p.
97. **Percy D, Egwu I, Jonas A. 1972.** Experimental *Brucella canis* infection in the monkey (*Macaca aractoides*). Canad. J. Comp. Med. 36: 221-225.
98. **Peter A. 2000.** Care and management of the breeding bitch. [Internet], [16 de febrero. 2013]. Disponible en: [www.vet.purdue.edu/depts/vcs/Peter/524femaleddog.html#top](http://www.vet.purdue.edu/depts/vcs/Peter/524femaleddog.html#top)
99. **Pickerill P. 1970.** Canine Brucellosis: Serological Host Range, and Epidemiological studies. Thesis. Cornell University. Ithaca, New York.
100. **Pollock R. 1980.** Canine Brucellosis: Current status. Compendium on continuing education. 255-268p.
101. **Porte F, Naroeni A, Ouahrani-Bettache S. 2003.** Role of the *Brucella suis* lipopolysaccharide O antigen in phagosome genesis and in inhibition of phagosome-lysosome fusion in murine macrophages. Infect Immun 71. 1481-1490p.
102. **Ramírez H. 2006.** Prevalencia de brucelosis canina en dos distritos de la Provincia Constitucional del Callao. Rev Inv Vet Perú; 17 (1): 39-43.
103. **Randhawa A, Kelly V, Baker E. 1977.** Agglutinins to *Coxiella burnetii* and *Brucella* spp, with particular reference to *Brucella canis*, in wild animals of southern Texas. [J Am Vet Med Assoc.](#) Nov 1;171(9):939-42.
104. **Reyes F. 1977.** Diagnóstico serológico de brucelosis canina causada por *Brucella canis* en Lima Metropolitana. Tesis bachillerato. Fac. Med. Vet. Univ. Nac. Mayor San Marcos Lima. 26p
105. **Rhoades HE, Mesfin GM. 1980.** *Brucella canis* infection in a kennel. Vet Med/Small Animal Clin. 595-599p.

106. **Rousseau P. 1985.** B. canis infection in a woman with fever of unknown origin. Postgrad Mexico. 253-254p.
107. **Salcedo SP, Maecheseni MI, Lelouard H. 2008.** Brucella control of dendritic cell maturation is depended on the TIR-containing protein Btp1. PloS Pathology 4:1p.
108. **Salhi I, Boigegrain RA, Machold J, Weise C, Cloeckert A, Rouot B. 2003.** Characterization of new members of the group 3 outer membrane protein family of *Brucella spp.* Infect Immun 71 (8): 4326-4332p.
109. **Samartino LE, Enright F. 1996.** Brucella abortus differs in the bovine chorioallantoic membrane explants from early and late gestation. Comp Immunol Microbiol Infect Dis. 19: 55-63p
110. **Samartino LE, Traux RE, Enright F. 1994.** Invasion and replication of Brucella abortus in three different trophoblastic cell lines. Zentralbl Veterinarmed B. 41. 229-236p.
111. **Sbriglio JL, Sbriglio H, Sainz H. 2007.** Brucellosis. Revista Bioanálisis:19-22p
112. **Scheffel J. 2003.** Brucella canis: Potential for zoonotic transmission. Compendium. 25(11):846-852p.
113. **Schoenemann J, Lutticken R, Scheibner E. 1986.** B. canis infection in man. Dtsch Med Wochenschr. 3: 20-22p.
114. **Serikawa T, Takada H, Kondo Y, Yamada J. 1984.** Multiplication of Brucella canis in male reproductive organs and detection of autoantibody to spermatozoa in canine brucellosis. Dev Biol Stand. 56: 295-305p
115. **Shin S, Carlmichael L E. 1999.** Canine brucellosis caused by *Brucella canis*. Recent advances in canine infectious diseases. In: Carmichael LE (Ed). Ithaca NY. International veterinary information service. Document nr A0101.1199 ([www.ivis.org](http://www.ivis.org))
116. **Stoenner H, Kaplan W. 1979.** Handbook series in zoonoses. CRP Pres. USA. Vol I. 185-191, 217-222.
117. **Smeak DD, Olmstead ML, Hohn RB. 1987.** B. canis osteomyelitis in two dogs with total hip replacement. J Am Vet Med Assoc. 191: 986-990p.
118. **Spink W. 1970.** Comments on canine brucellosis due to *Brucella canis*. J. Am. Vet. Med. Assoc. 156: 1734-1736p.
119. **Swenson R. 1972.** Human infection with *Brucella canis*. Annals. Int. Med., (76): 435-438p.
120. **Taul LK, Powell HS, Baker OE. 1967.** Canine Abortion. Due to an unclassified gramnegative bacterium. Vet. Med. Small Animal Clinician. 543-544p.
121. **Thursfield M. 1990.** Epidemiología Veterinaria. Editorial Acribia, España. 42p.

122. **Tizard I. 1998.** Inmunología Veterinaria. 5ta Ed. Editorial Interamericana McGraw Hill. Mexico. 242-248p.
123. **Vadillo S, Píriz S, Mateos E. 2002.** Manual de Microbiología Médica. Mc Graw-Hill Interamericana (Eds). Madrid, España. 119-131p, 275-292p
124. **Veliz N, Rosadio R. Barreto D, Castagnino D. 1974.** Difusión en agar gel. Prueba de campo para el estudio de la epididimitis a *Brucella ovis*. Rev Inv Pec IVITA-UNMSM 3(1): 23-28p
125. **Verger J, Grimont M, Grimont F, Grayon, M. 1985.** *Brucella*, a monospecific genus as shown by deoxyribonucleic acid hybridization. *Int J Syst Bacteriol* (35): 292–295.
126. **Vinayak A, Greene CE, Moore PA. 2004.** Clinical resolution of *Brucella canis*-induced ocular inflammation in a dog. J Am Vet Med Assoc. 224: 1804-1807p.
127. **Von Kruedener. 1976.** Outbreak of a *Brucella canis* infection in a Beagle colony in West Germany. Dev Biol Stand. 31: 251-253p..
128. **Wallach J, Gianbartolomei G, Balde P, Fossati P. 2004.** Human infection with M-strain of *Brucella canis*. Emerg Infect Dis. 10(1): 71-73p.
129. **Wanke MM. 2004.** Canine brucellosis. Anin Reprod Sci. 82-83: 195-207p.
130. **Weber A, Schliesser T. 1978.** The occurrence of antibodies to *Brucella canis* in domestic dogs in The Federal Republic of Germany. Berl Munch Tierarztl Wochenschr 91(2): 28-30p.
131. **Wilson G. 1983.** Principles of bacteriology, virology and immunity. Systematic Bacteriology. 7ma Edición Vol (2). Butler & Tanner (Eds). Londres. 406-418p
132. **Xavier M, Paixao T, den Hartigh A, Tsolis R, Santos RL. 2010.** Pathogenesis of *Brucella* sp. The Open Veterinary Science Journal. 4. 109-118p.
133. **Zoha SJ, Carlmichael LE. 1982.** Serological responses of dogs to cell Wall and internal antigens of *Brucella canis*. Vet Microbiol 7: 35-50p.

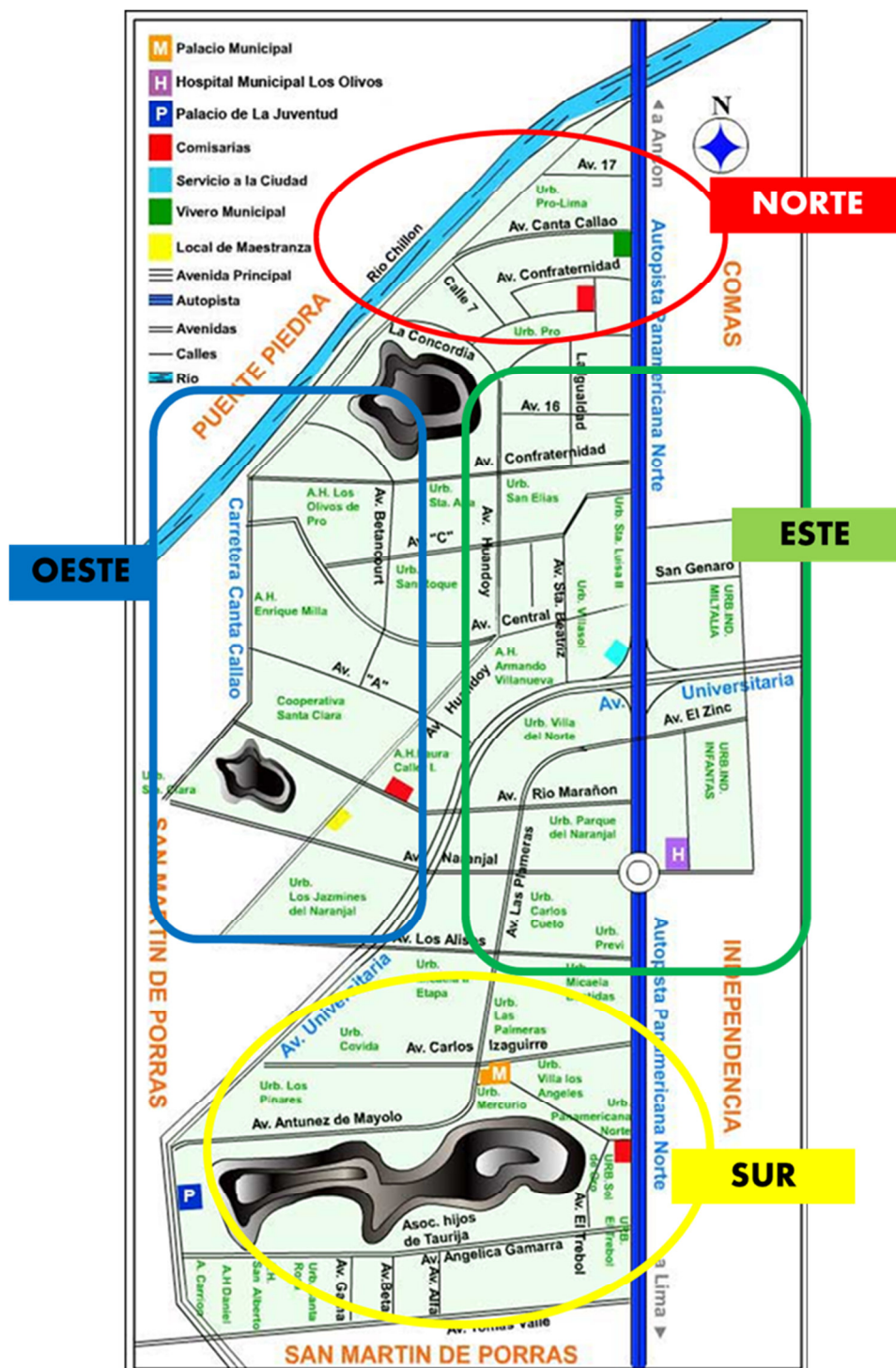
## **VIII. ANEXOS**

# ANEXO 1. Espacio geográfico: Distrito de los olivos





## ANEXO 2. Ubicación geográfica de las zonas del muestreo en el Distrito de Los Olivos





### ANEXO 3. Encuesta realizada a propietarios de las mascotas muestreadas

#### DISTRITO DE LOS OLIVOS

##### INFORMACION DEL PERRO

###### Sexo

Hembra ☐ Macho ☐

###### Raza

Cx ☐ De Raza ☐ .....

###### Edad

< 1 año ☐ 1 - 4 años ☐ 5 - 8 años ☐ 9 - 15 años ☐

Sale a Pasear a Parque y jardines? Si ☐ No ☐

Con que Frecuencia? .....

Se ha cruzado alguna vez? Si ☐ No ☐

Cuantas veces? .....

Con cuantos animales? .....

Quedo Preñada? Si ☐ No ☐

Cuantas crías fueron? .....

Ha tenido abortos o murieron las crías

en sus primeros días?

Abortos ☐ Muerte crías ☐

Que enfermedad ha tenido? .....

#### ANEXO 4. Asociación Diagnóstico *Brucella canis* y sexo

Dx. <i>Brucella</i>	Sexo		Total
	Hembra	Macho	
Negativo	124	150	269
	94.66	95.39	95.05
Positivo	7	7	14
	5.34	4.61	4.95
TOTAL	131	157	283
	100	100	100

Pearson chi2 = 0.0816 Pr = 0.775

# ANEXO 5. Asociación *Brucella canis* y edad

Dx Brucella	Edad				Total
	≤ 1 año	1 - 4 años	4 - 8 años	8 - 15 años	
<b>Negativo</b>	85	111	57	21	274
	97.7	94.07	91.94	100	95.14
<b>Positivo</b>	2	7	5	0	14
	2.3	5.93	8.06	0	4.86
<b>Total</b>	87	118	62	21	288
	100	100	100	100	100

Fisher's exact = 0.313

**ANEXO 6. Asociación *Brucella canis* y condición fisiológica**

<b>Dx <i>Brucella</i></b>	<b>Condición Fisiológica</b>		<b>Total</b>
	<b>Entero</b>	<b>Esterilizado</b>	
<b>Negativo</b>	244 94.94	30 96.77	274 95.14
<b>Positivo</b>	13 5.06	1 3.23	14 4.86
<b>Total</b>	257 100	31 100	288 100

Fisher's exact = 1.000

1-sided Fisher's exact = 0.542

**ANEXO 7. Asociación *Brucella canis* y hábito de paseo en mascotas**

<b>Dx <i>Brucella</i></b>	<b>Hábito de paseo</b>		<b>Total</b>
	<b>No</b>	<b>Si</b>	
<b>Negativo</b>	40	234	274
	95.24	95.12	95.14
<b>Positivo</b>	2	12	14
	4.76	4.88	4.86
<b>Total</b>	42	246	288
	100	100	100

Fisher's exact = 1.000

1-sided Fisher's exact = 0.666

# **ANEXO 8. Asociación *Brucella canis* e historia de cruces**

<b>Dx <i>Brucella</i></b>	<b>Se ha Cruzado</b>		<b>Total</b>
	<b>No</b>	<b>Si</b>	
<b>Negativo</b>	145	66	211
	91.77	98.51	93.78
<b>Positivo</b>	13	1	14
	8.23	1.49	6.22
<b>Total</b>	158	67	225
	100	100	100

Fisher's exact = 0.070

1-sided Fisher's exact = 0.044

**ANEXO 9. Resultados del modelo de regresión logística para evaluar el efecto de las variables predictoras sobre la variable respuesta (Modelo 1)**

Iteration 0: log likelihood = -52.36932  
 Iteration 1: log likelihood = -49.01625  
 Iteration 2: log likelihood = -48.55156  
 Iteration 3: log likelihood = -48.5425  
 Iteration 4: log likelihood = -48.54249

**LOGISTIC REGRESION**

Log likelihood = -48.54249

Number of obs = 224  
 LR chi2 (5) = 7.65  
 Prob > Chi2 = 0.1764  
 Pseudo R2 = 0.0731

<i>Dx Brucella</i>	Coef	Std. Err.	z	P> z	[95% Conf. Interval]
<b>Edad</b>	1.185855	0.7896764	1.5	0.133	-0.3618828 2.733592
<b>Sexo</b>	-0.0524852	0.5740557	-0.09	0.927	-1.177614 1.072643
<b>Condición fisiológica</b>	-0.5601112	1.10092	-0.51	0.611	-2.717874 1.597652
<b>Habito-paseo</b>	-0.1660571	0.8102065	-0.2	0.838	-1.754033 1.421918
<b>Se ha cruzado</b>	-1.923925	1.05552	-1.82	0.068	-3.992707 0.1448566
<b>Cons</b>	-3.0882	1.036353	-2.98	0.003	-5.119415 -1.056984

**ANEXO 10. Resultados del análisis de razón verosimilitud (Likelihood ratio test) para la evaluación del modelo global en relación al intercepto (Modelo 1)**

Log-Lik Intercept Only:	-52.369	Log-Lik Intercept Only:	-49.435
D (218):	98.869	LR (5):	5.869
		Prob > LR:	0.319
McFadden's R2:	0.056	McFadden's Adj R2:	-0.059
Maximun Likelihood R2:	0.026	Cragg & Uhler's R2:	0.069
McKelvey and Zavoina's R2:	0.193	Efron's R2:	0.023
Variance of Y*:	4.075	Variance of error:	3.29
Count R2:	0.938	Adj Count R2:	0
AIC:	0.495	AIC*n:	110.869
BIC	-1080.869	BIC':	21.189



**ANEXO 11. Modelo de regresión logística ajustado a las variables edad e historia de cruces, sobre el diagnóstico de *Brucella canis* (Modelo 2)**

Iteration 0: log likelihood = -52.433722  
 Iteration 1: log likelihood = -49.25891  
 Iteration 2: log likelihood = -48.834602  
 Iteration 3: log likelihood = -48.826558  
 Iteration 4: log likelihood = -48.826556

**LOGISTIC REGRESION**

Log likelihood = -48.826556

Number of obs = 225  
 LR chi2 (5) = 7.21  
 Prob > Chi2 = 0.0271  
 Pseudo R2 = 0.0688

<i>Dx Brucella</i>	Coef	Std. Err.	z	P> z	[95% Conf. Interval]
<b>Edad</b>	1.127396	0.7840474	1.44	0.15	-0.4093082 2.664101
<b>Se ha cruzado</b>	-1.942303	1.052588	-1.85	0.065	-4.005337 0.1207317
<b>Cons</b>	-3.26729	0.7207408	-4.53	0	-4.679916 -1.854664

**ANEXO 12.Resultados del análisis de razón de verosimilitud (Likelihood ratio test) para la evaluación del modelo reducido en relación al intercepto (Modelo 2)**

Log-Lik Intercept Only:	-52.434	Log-Lik Intercept Only:	-48.827
D (218):	97.653	LR (5):	7.214
		Prob > LR:	0.027
McFadden's R2:	0.069	McFadden's Adj R2:	0.012
Maximun Likelihood R2:	0.032	Cragg & Uhler's R2:	0.085
McKelvey and Zavoina's R2:	0.211	Efron's R2:	0.028
Variance of Y*:	4.168	Variance of error:	3.29
Count R2:	0.938	Adj Count R2:	0
AIC:	0.461	AIC*n:	103.653
BIC	-1104.721	BIC':	3.618

**ANEXO 13. Asociación de *Brucella canis* e historia de aborto (Solo en población de hembras muestreadas)**

<b>Dx <i>Brucella</i></b>	<b>Abortos</b>		<b>Total</b>
	<b>No</b>	<b>Si</b>	
<b>Negativo</b>	123	1	124
	94.62	100	94.66
<b>Positivo</b>	7	0	7
	5.38	0	5.34
<b>Total</b>	130	1	131
	100	100	100

Fisher's exact = 1.000

1-sided Fisher's exact = 0.947

**ANEXO 14. Asociación de *Brucella canis* e historia de parto con crías muertas (Solo en población de hembras muestreadas)**

<b>Dx <i>Brucella</i></b>	<b>Crías Muertas</b>		<b>Total</b>
	<b>No</b>	<b>Si</b>	
<b>Negativo</b>	118	6	124
	94.4	100	94.66
<b>Positivo</b>	7	0	7
	5.6	0	5.34
<b>Total</b>	125	6	131
	100	100	100

Fisher's exact = 1.000

1-sided Fisher's exact = 0.715

### ANEXO 15. Cuadro de las Variables utilizadas

VARIABLE	DESCRIPCION	VALORES	NOMBRE
Respuesta	Presencia de Anticuerpos contra <i>Brucella canis</i>	0 = Negativo 1 = Positivo	BRU
Predictora	Sexo	0 = Hembra 1 = Macho	SEX
Predictora	Edad	0 = $\leq 1$ año 1 = 1 - 4 años 2 = 4 - 8 años 3 = 8 - 15 años	EDA
Predictora	Raza	0 = Cruzado 1 = Raza	RAZ
Predictora	Vacunación	0 = No 1 = Si	VAC
Predictora	Condicion Física	0 = Entero 1 = Castrado	COND FIS
Predictora	Hábito ( Paseo)	0 = No 1 = Si	HAB
Predictora	Cruzado	0 = No 1 = Si	CRUZ
Predictora	Preñada	0 = No 1 = Si	PREÑ
Predictora	Aborto	0 = No 1 = Si	ABO
Predictora	Mortalidad Perinatal	0 = No 1 = Si	MOR